Untersuchungen zur Bedeutung immunsuppressiver Serumfaktoren bei der akuten und chronischen Hepatitis

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Norbert Brattig
aus Göttingen
1978

Untersuchungen zur Bedeutung immunsuppressiver Serumfaktoren bei der akuten und chronischen Hepatitis

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Norbert Brattig
aus Göttingen
1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 1978

Dekan:	Professor Dr. K.P. Hadeler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. P.A. Berg
2. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Braun

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P.A. Berg an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen Abteilung II, die von Herrn Prof. Dr. H.D. Waller geleitet wird.
Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Herrn Prof. Dr. P.A. Berg danke ich besonders für die Anregung zu diesem Thema, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie für die weiterführenden Ratschläge und wertvollen Diskussionen.

Weiterhin möchte ich danken:

- Herrn Dr. W. Bessler für sein Interesse und seine Unterstützung
- den Ärzten der Medizinischen Klinik Tübingen und des DRK-Krankenhauses in Hamburg für die gute Zusammenarbeit
- allen Mitarbeitern des Immunpathologischen Labors Prof. Dr. P.A. Berg für ihre Hilfsbereitschaft
- Frau M. Dürnay und Frau L. Deutschle für die photographischen Arbeiten
- Frau D. Knorre für das Schreiben des Manuskriptes

Seite

D Diskussion 115

I Nachweis von Seruminhibitionsfaktoren bei Patienten mit Hepatitis

II Immunsuppressive Eigenschaften von SIF 123

III Vergleich von SIF mit anderen suppressiven Faktoren 127

IV Bedeutung immunsuppressiver α-Globuline 135

V Klinische Relevanz von SIF 144

E Zusammenfassung 148

F Literaturverzeichnis 150

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0041

Inhaltsverzeichnis

			Seite
A		Einleitung	1
B		Patienten, Material und Methoden	12
	I	Patienten	
	II	Material	14
		1. Versuchstiere	
		2. Reagenzien	
		3. Weiteres Material	16
	III	Methoden	17
		1. Zytologische Methoden	
		1.1 Lymphozytenkultur	
		1.1.1 Lymphozytenisolierung	
		1.1.2 Mikrotitrierplattenkultur	
		1.1.3 Röhrchenkultur	18
		1.2 Bestimmung von Seruminhibitionsfaktoren (SIF)	20
		1.2.1 Ermittlung des Inhibitionsindex	
		1.2.2 Normal-Index und Aktivitätsgrade	21
		1.2.3 Reproduzierbarkeit des Testsystems	
		1.2.4 Normalseren	22
		1.2.5 Standardseren	
		1.3 Einfluß SIF-positiver Seren auf in vitro Lymphozyten-funktionen	23
		1.3.1 Lymphozytenstimulation im Vollblut	
		1.3.2 Spontane Lymphozytenproliferation	24
		1.3.3 Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation	
		1.3.4 PPD-induzierte Lymphozytenproliferation	27
		1.3.5 Gemischte Lymphozytenreaktion	28
		1.3.6 Leukozytenmigrationshemmung	29
		1.3.7 E-Rosettentest	30
		1.3.8 Mitogen-induzierte Proliferation von Mäuselymphozyten	31
		1.4 Kultur von Ehrlich Ascites Tumorzellen	
		2. Bestimmung von Serumproteinen	32
		2.1 Nachweis von HBV-Antigenen, -Antikörpern und anti HA-Antikörpern	
		2.2 Nachweis von Autoantikörpern	33

Seite

2.3 Nachweis von α_2-Makroglobulin 33

2.4 Nachweis von Immunkomplexen

2.5 Nachweis von Serumproteinen durch Immunelektrophorese 34

2.6 Nachweis anderer Serumproteine

3. Fraktionierung von Serum

3.1 Molekularfiltration

3.2 Gelfiltration 35

4. Statistische Methoden

5. Abkürzungen 36

C Ergebnisse 38

I Untersuchungen zur Standardisierung des Seruminhibitionsfaktoren (SIF)-Nachweises

1. Bedeutung der unterschiedlichen Stimulierbarkeit normaler Lymphozyten durch PHA

2. Einfluß SIF-positiver Seren auf die Proliferation heterologer Lymphozyten 42

3. Einfluß SIF-positiver Seren auf die Lymphozytenvitalität 45

4. Einfluß der PHA-Konzentration auf den SIF-Nachweis

5. Einfluß der Dauer der Lymphozytenkultur auf den SIF-Nachweis 47

6. Einfluß unterschiedlicher Konzentration von Normalserum in der Kultur auf den SIF-Nachweis 49

7. Einfluß virologischer, biochemischer und anderer Faktoren auf den SIF-Nachweis bei Patienten mit Hepatitis 50

II 1. SIF-Nachweis bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis 53

1.1 Nachweis von SIF im Ablauf der HB_sAg-positiven und HB_sAg-negativen akuten Virushepatitis

1.2 Nachweis von SIF bei 6 Patienten mit HB_sAg-positiver Hepatitis in der Inkubationsphase 54

1.3 Nachweis von SIF bei 20 Patienten mit HB_sAg-positiver chronischer Hepatitis 55

			Seite
II	2.	Mitogen-induzierte Lymphozytenstimulierbarkeit bei Patienten mit Hepatitis	60
	2.1	Stimulation in Normalserum	
	2.2	Stimulation im autologen Plasma	65
II	3.	Einfluß von SIF-positivem Serum auf die erhöhte spontane Proliferation von Patientenlymphozyten	
III		Eigenschaften von SIF	68
	1.	Einfluß SIF-positiver Seren auf die Lymphozyten-proliferation	69
	1.1	Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation	
	1.2	PPD-induzierte Lymphozytenproliferation	72
	1.3	Alloantigen-induzierte Lymphozytenproliferation	73
	2.	Einfluß SIF-positiver Seren auf die Leukozyten-migrationshemmung	75
	3.	Einfluß SIF-positiver Seren auf die E-Rosettenbildung	77
	4.	Kinetik und Reversibilität der SIF-Wirkung auf die PHA-induzierte Lymphozytenproliferation	80
	5.	Titration der SIF-Aktivität	85
	6.	Temperaturabhängigkeit der SIF-Aktivität	87
	7.	Nachweis von SIF-Aktivität nach Molekularfiltration und chromatographischer Serumfraktionierung	89
IV		Untersuchungen zur klinischen Relevanz des SIF-Nachweises	94
	1.	Klinische Relevanz des SIF-Nachweises bei Patienten mit HB_sAg-positiver chronischer Hepatitis und Leberzirrhose	
	2.	Klinische Relevanz des SIF-Nachweises bei Patienten mit juveniler lupoider Hepatitis	106
	3.	SIF-Nachweis bei anderen hepatischen und nicht hepatischen Erkrankungen	112

Seite

D Diskussion 115

I Nachweis von Seruminhibitionsfaktoren bei Patienten mit Hepatitis

II Immunsuppressive Eigenschaften von SIF 123

III Vergleich von SIF mit anderen suppressiven Faktoren 127

IV Bedeutung immunsuppressiver α-Globuline 135

V Klinische Relevanz von SIF 144

E Zusammenfassung 148

F Literaturverzeichnis 150

A EINLEITUNG

Die Virushepatitis ist eine verbreitete Infektionskrankheit, deren Bedeutung in den letzten Jahren zugenommen hat. Die Zahl der gemeldeten Erkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland beträgt ungefähr 20 000, die Dunkelziffer liegt wahrscheinlich bei 100 000. Man unterscheidet zwischen der Inokulations- oder Serumhepatitis (Hepatitis B, HB) mit einer langen Inkubationszeit von etwa 30 - 160 Tagen und der infektiösen oder epidemischen Hepatitis (Hepatitis A, HA) mit einer Inkubationszeit von 15 - 50 Tagen. Die Züchtung der Hepatitisviren A und B ist bisher nicht gelungen.

Die Entdeckung des Australia-Antigens im Jahre 1964 durch Blumberg (Blumberg et al., 1965) brachte entscheidende Impulse für die Hepatitisforschung. Das Australia-Antigen, das heute als HB_sAg (Hepatitis B surface antigen) bezeichnet wird, ist das im Überschuß produzierte Hüllenprotein des Hepatitis B-Virus (HBV). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden dem HB_sAg im Serum drei Strukturen zugeordnet: sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm, tubuläre Partikel mit einer Länge zwischen 50 - 300 nm (Zuckerman, 1969) und sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 42 nm, die als Dane-Partikel bezeichnet werden (Dane et al., 1970).

Das virusartige Dane-Partikel, das heute als Hepatitis B-Virus angesehen wird, besteht aus einer Hülle (Oberflächenantigen, HB_sAg) und einem Kern (Core-Antigen, HB_cAg; Almeida et al., 1971), der doppelsträngige DNS sowie DNS-Polymerase enthält (Kaplan et al., 1973; Robinson et al., 1974). Im Vergleich zum 20 nm-Partikel (HB_sAg) kommt das Dane-Partikel in HB_sAg-positiven Seren in sehr geringer Konzentration vor.

Neben dem HB_sAg und dem HB_cAg fanden Magnius und Espmark (1972) ein weiteres Antigen, das e-Antigen (HB_eAg), das nur in HB_sAg-positiven Seren vorkommt, aber nicht mit dem HB_sAg identisch ist. Nach Nordenfelt und Andrén-Sandberg (1976) sowie Cappel et al. (1977) besteht eine enge Assoziation zwischen dem Vorkommen von e-Antigen und DNS-Polymerase.
Während das HB_sAg, das e-Antigen sowie Dane-Partikel im Serum nachweisbar sind, ist das im Dane-Partikel enthaltene HB_cAg dort serologisch nicht erfaßbar. In der Leber findet sich das HB_sAg im Zytoplasma, das HB_cAg und wahrscheinlich das e-Antigen im Kern der Hepatozyten (Barker et al., 1973).

Von den Virus-assoziierten Antigenen im Serum spricht insbesondere das Vorkommen von e-Antigen und DNS-Polymerase für eine hohe, der Nachweis von anti-e-Antikörpern für eine niedrige oder fehlende Infektiosität eines HB_sAg-positiven Blutes (Krugman et al., 1974; Nielsen et al., 1974; Nordenfelt und Kjellen, 1975).

Durch die Isolierung von Viruspartikeln aus dem Stuhl akut erkrankter Patienten mit epidemischer Hepatitis gelang es auch bei der Hepatitis A, serologische Marker zu erfassen (Feinstone et al., 1973).

Es wird heute angenommen, daß es neben der Hepatitis A und B zumindest eine weitere Form der Virushepatitis gibt, die als NonA-NonB Hepatitis bezeichnet wird, da gezeigt werden konnte, daß Patienten nach Transfusionen an einer Hepatitis erkranken können, ohne daß dabei Antikörper gegen Hepatitis A oder B signifikant ansteigen. Diese Form der Hepatitis ist wahrscheinlich selten und betrifft etwa 10 - 20 % aller Hepatitisfälle (Feinstone et al., 1975).

Von Waldenström (1950) und Kunkel et al. (1951) wurde ferner eine Hepatitiserkrankung beschrieben, die fast ausschließlich junge Mädchen betraf und mit einer Hypergammaglobulinämie einherging. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Formen entwickelten diese Patienten immer eine chronisch aktive Hepatitis. Mackay et al. (1956) sowie Gajdusek (1957) wiesen später vor allem auf autoimmune Reaktionen bei dieser Hepatitisform hin und bezeichneten sie wegen des Auftretens von Lupus erythematodes (LE)-Zellen (Antikörper gegen Kerne) als lupoide Hepatitis.

Im allgemeinen ist der Verlauf der Virushepatitis A, B und NonA-NonB gutartig und Übergänge in ein chronisches Stadium kommen in etwa 5 - 10 % der Fälle nur bei der Hepatitis B und wahrscheinlich bei der NonA-NonB Hepatitis vor, während bei Hepatitis A kein sicherer Hinweis für den Übergang in Chronizität besteht.

Insbesondere die Beobachtungen bei der lupoiden Hepatitis und die immunologischen Verlaufsuntersuchungen bei der Hepatitis B haben die Frage nach der Immunantwort stärker in den Vordergrund gerückt, und man nimmt heute an, daß der Ablauf einer Virushepatitis weniger durch die Virulenz des infektiösen Agens bestimmt wird als durch die Intensität der Immunantwort.

Im Ablauf einer Infektion spielen Antigenerkennung, Induktion der zellvermittelten und humoralen Immunantwort und Elimination des infektiösen Agens eine wesentliche Rolle. Die Ausprägung der Immunreaktion ist wahrscheinlich genetisch determiniert und scheint von den mit den Histokompatibilitätsantigenen assoziierten Immunantwortgenen (Ia-Antigene) gesteuert zu werden (Mc Devitt et al., 1976). Träger der Immunreaktionen sind hauptsächlich die Thymus-abhängigen T-Lymphozyten und die Bursa-Äquivalent-abhängigen B-Lymphozyten.

Die T-Lymphozyten sind für die zellulären Immunreaktionen verantwortlich, insbesondere für zellvermittelte Zytotoxizität und die Bildung von Mediatoren, während die B-Lymphozyten in Kooperation mit T-Zellen und Makrophagen Antikörper bilden, über die ebenfalls zytotoxische Reaktionen vermittelt werden können, vor allem durch Aktivierung von nicht immunkompetenten Lymphozyten, den Killer (K)-Zellen, die über Fc-Rezeptoren mit den an der Zielzelle gebundenen Antikörpern reagieren.
Diese Immunreaktionen werden wahrscheinlich von einem komplexen System gesteuert, das eine Reihe von spezialisierten Subpopulationen der T-Lymphozyten wie Helferzellen und Suppressorzellen sowie zahlreiche Lymphokine mit einschließt.

Über Immunreaktionen während der Inkubationszeit der akuten Virushepatitis B (AVH-B) liegen beim Menschen praktisch keine und tierexperimentell nur wenige Befunde vor. Virus-assoziierte Antigene treten im Serum der Patienten bereits bis zu vier Wochen vor Beginn der Erkrankung auf, und später sind HB_sAg im Zytoplasma sowie HB_cAg im Kern der Leberzelle nachweisbar (Berquist et al., 1975). Wahrscheinlich kommt es vor Befall der Leber zu einem Wettlauf zwischen Virusmultiplikation in primär infizierten Zellen und der Proliferation und Differenzierung spezifischer T-Lymphozyten andererseits. Jedenfalls sprechen tierexperimentelle Untersuchungen dafür, daß nach einer Infektion primär zytotoxische T-Zellen aktiviert werden und es erst später, nach Befall des Zielorgans, zur Induktion von Antikörpern kommt (Blanden, 1971; Pang und Blanden, 1976; Dunlop et al., 1977). In Übereinstimmung damit waren nach Injektion von HB_sAg in Mäuse vor dem Nachweis von Antikörpern zunächst zellvermittelte Immunreaktionen nachweisbar (Roberts et al., 1975). Zu dieser Zeit besteht wahrscheinlich eine vorübergehende Anergie, die sich auch bei zahlreichen anderen Erkrankungen durch das Fehlen einer früher positiven Hautreaktion manifestiert.

Mit dem Ausbruch der Entzündung werden eine Vielzahl spezifischer und unspezifischer zellulärer und humoraler Immunreaktionen nachweisbar. Antikörper gegen HB_cAg (anti-HB_c) und e-Antigen (anti-e) treten bereits in den ersten Wochen der akuten Phase auf, während Antikörper gegen HB_sAg (anti-HB_s) oft erst nach vielen Wochen oder Monaten erfaßt werden. Auch organunspezifische Antikörper gegen Kerne (ANA) und glatte Muskulatur (SMA) sowie organspezifische Antikörper gegen Leber-spezifisches Lipoprotein (anti-LSP) sind bei einem Teil der Patienten nachweisbar.

In dieser Phase konnte auch eine spezifische Sensibilisierung der Lymphozyten aus dem peripheren Blut der Patienten gegenüber Virus-assoziierten Antigenen (HB_sAg) sowie LSP im Leukozytenmigrationshemmtest und im Lymphozytentransformationstest nachgewiesen werden (De Gast et al., 1973; Yeung Laiwah et al., 1973; Irwin et al., 1974; Howlett und Mc Guigan, 1975; Ibrahim et al., 1975;

De Moura et al., 1975; Tong et al., 1975; Meyer zum Büschenfelde et al., 1976; Thestrup-Pedersen et al., 1976; Lee et al., 1977). Hierbei kommt es bei Kontakt der sensibilisierten Lymphozyten mit dem entsprechenden Antigen entweder zur Produktion von Lymphokinen, die die Wanderung von Leukozyten oder Makrophagen hemmen oder zu einer verstärkten Lymphozytenproliferation, die sich durch den Einbau von radioaktivem Thymidin messen läßt.

Ferner ließ sich zeigen, daß Lymphozyten von Patienten mit akuter Virushepatitis B in vitro auch direkt zytotoxisch gegen Leberzellen reagieren können, allerdings wurden bei diesen Versuchen keine autologen Hepatozyten, sondern Kaninchenleberzellen verwandt (Cochrane et al., 1976 a). Diese Befunde sprechen dafür, daß die Zerstörung der Hepatozyten nicht durch die Replikation der Viren, sondern vor allem durch Immunreaktionen entweder zytotoxischer T-Lymphozyten oder Antikörper-abhängiger K-Zellen ausgelöst wird, wobei man annimmt, daß sich die Reaktionen insbesondere gegen HB_sAg oder LSP in der Leberzellmembran richten (Meyer zum Büschenfelde et al., 1972; Cochrane et al., 1976 b; Eddleston und Williams, 1976; Kawanishi und Mac Dermott, 1977).

Für die Beteiligung autoimmuner Reaktionen spricht das Vorkommen von Autoantikörpern gegen Kerne, glatte Muskulatur und LSP sowie der Nachweis einer Hemmung der zytotoxischen Reaktionen durch Zugabe von LSP (Thomson et al., 1974).

Neben diesen Berichten über Antigen-spezifische Immunreaktionen liegen zahlreiche Untersuchungen über Anteil und Aktivität der T-Lymphozyten während der akuten Phase der Hepatitis B vor. Verschiedene Autoren bestimmten im peripheren Blut der Patienten die Anzahl von T-Lymphozyten mit Hilfe des E-Rosettentestes, der darauf beruht, daß T-Zellen Schafserythrozyten (E) unspezifisch binden, sowie die Zahl der B-Lymphozyten fluoreszenzmikroskopisch mit markierten Antikörpern gegen die Immunglobulinrezeptoren. Die B-Zellpopulation ließ keine Unterschiede zu Kontrollpersonen erkennen, dagegen liegen über die T-Lymphozytenpopulation widersprüchliche Befunde vor. Während Wicks et al. (1975) keine Unterschiede zwischen Patienten mit AVH und Normalpersonen feststellen konnten, und Schumacher et al. (1975) eine erhöhte T-Rosettenbildung

in der frühen akuten Phase fanden, wiesen De Horatius et al. (1976), Chisari et al. (1976) sowie Nakao et al. (1975) demgegenüber eine erniedrigte T-Rosettenbildung im Frühstadium der AVH nach. Chisari et al. fanden ferner einen deutlich erhöhten Anteil von Nullzellen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß beide Oberflächenmarker fehlen.
Weiterhin konnte eine erhöhte spontane Proliferation in der frühen Phase der AVH-B von einigen Autoren nachgewiesen werden, indem sie nach 4-8-stündiger Inkubation der Patientenlymphozyten einen erhöhten ^{3}H-Thymidineinbau ermittelten (Sodomann et al., 1974; Schumacher et al., 1975). Diese erhöhte spontane Lymphozytenproliferation, die bei zahlreichen Infektionen sowie nach Antigenstimulation beobachtet werden konnte, läßt auf in vivo aktivierte Lymphozyten schließen (Wood und Frenkel, 1967; Crowther et al., 1969).

Zahlreiche Untersuchungen wurden auch durchgeführt, um die Frage zu klären, ob die Funktion der Lymphozyten während der akuten Virushepatitis B verändert ist. Die Ergebnisse der Stimulierbarkeit der Patientenlymphozyten durch unspezifische Mitogene, insbesondere Phytohämagglutinin (PHA), sind widersprüchlich. Eine Reihe von Autoren fanden in der frühen Phase der AVH eine erniedrigte Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation (Willems et al., 1969; Martini et al., 1970; Agarwal et al., 1971; Newble et al., 1975; Andersen et al., 1976), während nach Sodomann et al. (1974) sowie Schumacher et al. (1975) die Stimulation in der frühen Phase erhöht war. In anderen Arbeiten konnten keine Unterschiede zu gesunden Lymphozytenspendern nachgewiesen werden (Tong et al., 1975; Wicks et al., 1975; Gutman et al., 1975; Wands et al., 1975 a). Die Befunde lassen keine Aussage über eine veränderte Lymphozytenfunktion zu.

Die angeführten Untersuchungen wurden vor allem im Hinblick auf die Frage durchgeführt, ob aus diesen immunologischen Parametern Hinweise gewonnen werden können, die den Übergang in ein chronisches Stadium anzeigen. Die Ursachen der Chronizität sind bisher nicht bekannt. Verschiedene Hypothesen sind aufgestellt worden, die die Entwicklung einer HB_sAg-positiven und einer HB_sAg-negativen chronischen Hepatitis zu erklären versuchen. Dudley et al. (1972) nahmen

an, daß die Viren aufgrund einer defekten zellvermittelten Immunität nicht eliminiert werden. Eddleston und Williams (1974) postulierten dagegen, daß es dann zu einer fortschreitenden entzündlichen Reaktion kommt, wenn zu wenig Antikörper oder Antikörper mit zu geringer Affinität gebildet werden, so daß die Leber ständig reinfiziert werden kann.
Bei der HB_sAg-negativen chronischen, insbesondere der lupoiden Hepatitis sind nach Popper und Mackay (1972) und Eddleston und Williams (1974) autoimmune Prozesse entscheidend, wobei eine gesteigerte, nicht kontrollierte Antikörpersynthese vorzuliegen scheint. Eddleston vermutete, daß autoimmune Reaktionen, die bei der akuten Virushepatitis nur vorübergehend auftreten, aufgrund eines Defektes der T-Suppressorzellen auch nach Elimination der Viren weiter bestehen. In Übereinstimmung damit stehen die Ergebnisse von Hodgson et al. (1977), die eine erniedrigte Suppressorzellenaktivität bei Patienten mit CAH nachweisen konnten.

Da bei Patienten mit HB_sAg-negativer Hepatitis die Histokompatibilitätsantigene HLA-B 8 und HLA-A 1 (Galbraith et al., 1974; Hug, 1976) wie bei einigen autoimmunen Erkrankungen gehäuft gefunden werden (Mc Devitt und Bodmer, 1974), vermutete man, daß diese HLA-Antigene ein Marker für eine gestörte Suppressorzellfunktion sind (Eddleston und Williams, 1976).

In tierexperimentellen Untersuchungen konnte der Zusammenhang von Autoimmunität und Suppressorzelldefekt weiter erhärtet werden. Krakauer et al. (1976) konnten zeigen, daß die Lymphozyten von NZB/NZW-Mäusen, die eine dem Lupus erythematodes vergleichbare autoimmune Erkrankung haben, nach ConA-Aktivierung auffallend wenig "soluble immune response suppressor (SIRS)" bilden, der wahrscheinlich ein Mediator der T-Suppressorzellen ist (Rich und Pierce, 1974). Da durch SIRS andererseits autoimmune Reaktionen unterdrückt wurden, nahmen die Autoren an, daß bei autoimmunen Erkrankungen ein Defekt der Suppressorfunktion und Mediator (SIRS)-bildung vorliegt. Krakauer et al. diskutierten diese Befunde hinsichtlich therapeutischer Konsequenzen für Autoimmunkrankheiten.

Aus der Persistenz von Auto-Antikörpern wurde vor allem bei der lupoiden Hepatitis auf eine schlechte Prognose geschlossen. Bei HB_sAg-positiven Hepatitiden fehlen jedoch solche Indikatoren und auch die prognostische Bedeutung des e-Antigens ist heute umstritten (Thamer et al., 1976; Cappel et al., 1977).

Die Untersuchungen zellvermittelter Immunreaktionen bei HB_sAg-positiven Hepatitiden lassen eher Aussagen zur Ätiologie als zur Prognose der Krankheit zu (Howlett und Mc Guigan, 1975; Lee et al., 1975). Eine defekte T-Lymphozytenfunktion konnte bei Patienten mit chronischer Hepatitis nicht nachgewiesen werden, lediglich eine erniedrigte T-Lymphozytenzahl scheint nach Untersuchungen von De Horatius et al. (1974), Thomas et al. (1976) sowie Colombo et al. (1977) vorzuliegen.

Im Ablauf der Immunreaktionen treten eine Vielzahl löslicher Reaktionsprodukte auf, die auch regulierende oder amplifizierende Eigenschaften aufweisen (Waksman und Namba, 1976). So setzen T-Lymphozyten, Makrophagen und möglicherweise auch B-Lymphozyten Antigen-spezifische sowie nicht-spezifische Faktoren frei (Cohen et al., 1977; Waksman, 1977). Auf einen Mediator der T-Suppressorzellen wurde bereits hingewiesen.

Bisher wies man diese Faktoren vor allem in Überständen von stimulierten Lymphozyten- und Makrophagenkulturen nach. Neuerdings konnte gezeigt werden, daß verschiedene Lymphokine auch im Serum vorkommen, wie z.B. Interferon (Salvin et al., 1974), Migrationsinhibitionsfaktor (Yoshida et al., 1975; Bruley-Rosset et al., 1977), Lymphotoxin (Masters et al., 1976) sowie der Allogeneische Faktor (Dardenne und Bach, 1977). Obwohl nur von einigen der zahlreichen neuerdings beschriebenen suppressiven Serumfaktoren sicher ist, daß sie immunologische Reaktionsprodukte sind (Tomasi, 1977), nimmt man auch für weniger gut charakterisierte Faktoren sowie für die häufig beschriebene Hemmung der Lymphozytenstimulation durch Patientenseren an, daß sie in Zusammenhang mit immunologischen Vorgängen auftreten. Dafür spricht unter anderem, daß diese Phänomene, ähnlich wie die bisher im Serum nachgewiesenen Lymphokine, vor allem nach starker oder

persistierender Antigenstimulation vorkommen, z.B. bei Infektionen oder autoimmunen Erkrankungen (Nelson und Gatti, 1976). Masters et al. (1977) vermuteten, daß es sich bei diesen Faktoren um Indikatoren einer bestehenden Immunreaktion handelt.

Für einen Zusammenhang zwischen Immunsuppression und Antigenstimulation sprechen auch tierexperimentelle Untersuchungen von Burger et al. (1974). Verschiedene Autoren postulierten ferner eine Beziehung zwischen Seruminhibitoren und der anergischen Phase, die bei den angesprochenen Erkrankungen häufig beobachtet wurde (Kantor, 1975; Cooperband et al., 1976).

Auch in Seren von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis sind suppressive Effekte beschrieben worden. In den meisten Fällen wiesen die Autoren eine Hemmung Mitogen-induzierter Lymphozytenproliferation in Gegenwart der Patientenseren nach, konnten allerdings Effekte durch eine veränderte Nährstoff- oder Mitogenkonzentration nicht ausschließen. Nur von zwei Arbeitsgruppen wurden Serumfaktoren weiter charakterisiert.

Als erste stellten Mella und Lang (1967) und Mella (1969) fest, daß die Mitoserate PHA-stimulierter Lymphozyten durch Serum von Patienten der präikterischen und frühen ikterischen Phase einer infektiösen Hepatitis gehemmt war. Die Autoren nahmen an, daß die Inhibition durch das Virus hervorgerufen wurde.
Bei ihren Untersuchungen zum Nachweis nicht zytopathogener Viren mit Hilfe PHA-stimulierter Lymphozyten beobachteten Willems et al. (1969) in Übereinstimmung mit Mella, daß der Einbau von ^{3}H-Thymidin durch Serum aus der frühen Phase der epidemischen Hepatitis sowie der Serumhepatitis erniedrigt wurde.

Suppressive Serumeffekte beobachteten auch Pappas et al. (1970), als sie die Stimulierbarkeit der Lymphozyten von Patienten mit epidemischer Hepatitis im frühen Stadium testeten. Während die Lymphozyten von gesunden Spendern im autologen Serum deutlich stärker reagierten als im Patientenserum, zeigten die

Patientenlymphozyten sowohl im autologen als auch im normalen Serum eine schwache PHA-Stimulation. Gleichzeitig mit der Serumhemmung trat bei den Patienten eine negative Hautreaktion auf. Auch Baroyan et al. (1970) beschrieben ähnliche Hemmungen durch Hepatitis A-Seren.

Newble et al. (1975) fanden bei Verlaufsuntersuchungen der PHA-induzierten Lymphozytenstimulation in Vollblutkulturen bei Patienten mit akuter Virushepatitis A und B eine stark erniedrigte Stimulierbarkeit in der ersten Woche nach Auftreten des Ikterus und eine schwache Reaktion in den folgenden Wochen. Die Seren der Patienten unterdrückten sowohl die Proliferation der autologen als auch der homologen Lymphozyten. Einen niedrigen ^{3}H-Thymidineinbau der gewaschenen Patientenlymphozyten fanden die Autoren auch bei Zusatz von fötalem Kälberserum, woraus sie folgerten, daß im Ablauf der AVH sowohl ein Defekt der Lymphozyten (intrinsic) als auch der Seren (extrinsic) vorlag.

Newberry et al. (1973), Nakao et al. (1975) sowie Tremolada et al. (1977) berichteten, daß auch Seren von Patienten mit verschiedenen Formen einer chronischen Hepatitis die PHA-Stimulation normaler Lymphozyten hemmten. Nach Newberry et al. bestand keine Korrelation mit der Konzentration von Bilirubin, Transaminasen oder alkalischer Phosphatase. Zytotoxische Effekte und Nährstoffmangel als Ursache der Hemmung konnten Newberry et al. ausschließen.

Geubel et al. (1976) beobachteten bei Patienten mit chronischer Hepatitis, daß der Nachweis einer hemmenden Serumaktivität mit einer erniedrigten Zytotoxizität der Lymphozyten gegen autologe Hepatozyten assoziiert war.

Wands et al. (1975 a) stellten demgegenüber fest, daß die ConA-induzierte Lymphozytenproliferation sowie Lymphozytotoxizität bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis in Gegenwart von Normalserum nicht gestört war, dagegen durch das autologe Patientenserum unterdrückt wurde. Untersuchungen der Arbeitsgruppe an 10 Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis ergaben, daß die Seren nur bei einer bestehenden entzündlichen Aktivität in der Leber hemmten. Nach vorläufigen Untersuchungen liegt das Molekulargewicht der durch Gelfiltration gewonnenen Serumfaktoren bei etwa 200 000 Dalton (Wands et al., 1975 b).

Chisari und Edgington (1975) isolierten einen anderen Faktor aus Hepatitisseren, der die Rosettenbildung von Lymphozyten mit Schafserythrozyten unterdrückte. Dabei handelte es sich um ein Lipoprotein mit einem Molekulargewicht von 2.5×10^6 Dalton. Der Rosetten-inhibierende Faktor (RIF) war ebenfalls bei der akuten und chronischen Hepatitis nachweisbar und mit dem Leberzellschaden assoziiert. Die Proliferation von Lymphozyten beeinträchtigte dieser Faktor nicht. Wie Wands postulierten auch Chisari et al. (1977), daß der Nachweis von RIF prognostische Bedeutung hat. Chisari et al. zeigten weiterhin, daß Lymphozyten von Patienten mit AVH auch in Abwesenheit des autologen RIF-positiven Serums eine erniedrigte Rosettenbildung aufwiesen (intrinsic defect), die jedoch durch Verwendung von Neuraminidase-behandelten Schafserythrozyten gesteigert werden konnte.

In eigenen Untersuchungen zur Bedeutung der zellvermittelten Immunreaktionen bei der akuten Virushepatitis zeigte sich bei der Stimulation von Patientenlymphozyten mit verschiedenen Mitogenen und Antigenen in Übereinstimmung mit den bisherigen Befunden, daß Seren aus der frühen Phase der AVH sowie von Patienten mit CAH die Proliferation der Lymphozyten unterdrückten. Vor allem der Nachweis von Seruminhibitionsfaktoren (SIF) auch während der Inkubationsphase der AVH sprach dafür, daß es sich um Faktoren handelte, die unabhängig von der entzündlichen Reaktion in der Leber vorkamen (Brattig und Berg, 1976).

In Anbetracht dieser Beobachtungen schien es uns von Wichtigkeit, diese Serumaktivität näher zu charakterisieren, vor allem auch im Hinblick auf die Bedeutung für die Klinik.

Ziel der Untersuchungen war es deshalb, ein Testsystem auszuarbeiten, das einen zuverlässigen Nachweis von Serumhemmfaktoren (SIF) ermöglichte und unspezifische Reaktionen soweit wie möglich ausschloß. Weiterhin sollte der Einfluß von Seruminhibitionsfaktoren auf Lymphozytenreaktionen in vitro untersucht werden. In Verlaufsbestimmungen an Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis sollte ferner die klinische Relevanz des SIF-Nachweises geprüft werden.

B PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

I PATIENTEN

Seren und Lymphozyten stammten von Patienten aus der Medizinischen Klinik, Abteilung Prof. Dölle, der Universität Tübingen, dem Deutschen Roten Kreuz (DRK)-Krankenhaus Hamburg (Prof. Lindner †) sowie der Kinderklinik Tübingen (Prof. Bierich).

Insgesamt wurden 46 Patienten mit unkompliziert verlaufender akuter Virushepatitis (AVH) untersucht. Bei 25 Patienten wurde die Lymphozytenstimulierbarkeit getestet, 13 von ihnen unter einheitlichen Versuchsbedingungen. Die Bestimmung von Seruminhibitionsfaktoren erfolgte bei 28 Patienten. In Tabelle 1 sind die wichtigsten serologischen, klinischen Befunde der Patienten aufgeführt.

Tabelle 1 Befunde bei 46 Patienten mit AVH

Geschlechtsverteilung (männlich/weiblich)		27 / 19
Alter		28 ± 10 Jahre
AVH-B (HB_sAg-, aHB_s-positiv)		35
AVH-A (aHA-Titeranstieg)		7
AVH-NonA-NonB (HB_sAg-, aHB_s-, aHA-negativ)		4
max. Transaminasenanstieg (SGPT)	100 - 400 IE/l	9
	400 -1000 IE/l	37
max. Bilirubinkonzentration	20 - 100 µ m/l	6
	100 - 250 µ m/l	15
	250 - 500 µ m/l	25
max. γ -Globulinkonzentration	< 20 rel.%	26
	20-30 rel.%	20
alkalische Phosphatase	50 - 100 IE/l	11
Blutsenkungsgeschwindigkeit	> 30 mm n.W./Std.	8

Untersucht wurden weiterhin 101 Patienten mit einer chronischen HB_sAg-positiven Hepatitis, 21 Patienten davon mit einer chronisch persistierenden Hepatitis (CPH), 52 Patienten mit einer chronisch aktiven Hepatitis (CAH) und 28 Patienten mit Leberzirrhose (LC). Die Diagnose stützte sich auf histologische Kriterien (de Groote et al., 1968) unter Einbeziehung klinischer und serologischer Befunde.

27 Patienten wurden über einen Zeitraum von 1,5 - 6 Jahren beobachtet und wiederholt leberbiopsiert.

Unter 58 Patienten mit HB_sAg-negativer chronischer Hepatitis hatten 35 eine chronisch aktive Hepatitis (CAH) und 23 Patienten eine Leberzirrhose.

Von den 8 Patienten mit juveniler lupoider Hepatitis sind die charakteristischen Befunde in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2 Aufnahmebefunde von 8 Patienten mit juveniler lupoider Hepatitis

Geschlechtsverteilung (männlich/weiblich)		2 / 6
Alter		15 ± 3 Jahre
HB_sAg, aHB_s, aHB_c		Ø
aHA		Ø
γ-Globulinkonzentration		48 ± 11 rel.%
Autoantikörper: Antikörper gegen Kerne		8
Antikörper gegen glatte Muskulatur		8
Antikörper gegen DNS		5/5*
Transaminasenerhöhung (SGOT)	100 - 400 IE/l	5
	400 - 1000 IE/l	3
Bilirubinkonzentration	< 100 µmol/l	8
alkalische Phosphatase	50 - 100 IE/l	5
	> 100 IE/l	3
Blutsenkungsgeschwindigkeit	< 30 mm n.W./h	3
	> 30 mm n.W./h	5

Leberbiopsie im ersten halben Jahr: schwere akute Hepatitis oder Zeichen einer chronisch aktiven Hepatitis

*nur Seren von 5 der 8 Patienten konnten auf anti-DNS-Antikörper untersucht werden

Die Patienten stammten aus der Medizinischen Klinik in Tübingen, dem DRK-Krankenhaus in Hamburg, der Kinderklinik Ulm, dem Kreiskrankenhaus in Starnberg sowie dem Städtischen Krankenhaus in München.

Alle Seren wurden entweder sofort getestet oder bei -20°C gelagert. Vor Verwendung wurden sie durch Erhitzen auf 56° C für 30 Minuten dekomplementiert und durch Milliporefilter (Porengröße 0.45 µm) sterilfiltriert.

II MATERIAL

1. Versuchstiere

Mäusemilzzellen wurden aus 6 Wochen alten C3H-Mäusen gewonnen, die Dr. W. Bessler, Mikrobiologie II der Universität Tübingen, zur Verfügung stellte.

Ehrlich Ascites Tumorzellen wurden aus NMRI-Mäusen isoliert, die aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen stammten.

2. Reagenzien

Medien

- TC 199-Kulturmedium, HEPES gepuffert, von Flow Laboratories, Bonn (Kat.Nr. 1-048)
- RPMI 1640 von Gibco Laboratories (Kat.Nr. 240)
- Minimal Essential Medium (MEM) von Flow Labs. (Kat.Nr. 1F-225)
- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium von Flow Labs. (Kat.Nr. 1-002)

Puffer

- Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) von Flow Labs. (Kat.Nr. 3-022)
- HEPES-Puffer von Flow Labs. (Kat.Nr. 3-065)

Mitogene , Seren und andere Reagenzien

- Phytohämagglutinin-P (PHA) von Difco-Laboratories, Detroit, Michigan, USA (Kat.Nr. 3110-56), PHA von Wellcome Company, Großburgwedel
- Concanavalin A (ConA) von Serva Feinchemica (Kat.Nr. 17475 M)
- Concanavalin A von Difco-Labs. (Kat.Nr. 3351-57-1)
- Limabohnenlektin (Lima) von Dr. W. Bessler*
- Pokeweedmitogen (PWM) von Grand Island Biological Company (Gibco), Grand Island, USA (Kat.Nr. 536)
- Staphylokokken (Staph.aureus) Protein A-Sepharose CL-4B (SPA) von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden (Kat.Nr. 2315)
- Lipopolysaccharid (LPS) E.coli von Difco-Labs. (Kat.Nr. 055:B5)
- Purified Protein Derivate (PPD), Tuberkulin GT von den Behringwerken, Marburg
- Fluoreszein-konjugiertes Ziegenglobulin-anti-Humanglobulin G, M, A von Hyland Laboratories, Travenol, München (Kat.Nr. 072-202)
- Ziegenserum-anti Humanserum von Hyland
- Humanserum von Flow Labs. (Kat.Nr. 4-030 B)
- Humanes AB-Serum von Gibco Labs. (Kat.Nr. 615 AB)
- Hammelerythrozyten aus den Behringwerken, Marburg (Kat.Nr. ØRAW 30)
- Agarose von Serva Feinchemica, Heidelberg (Kat.Nr. 11397)
- Agarose HSA von Litex, Dänemark
- Combithek, Eichproteine von Boehringer, Mannheim
- Liquemin 25 000 von Hoffmann-La Roche, Grenzach
- Lymphoprep^{R} von Nyegaard, Oslo, Norwegen
- Penicillin-Streptomycin von Flow-Labs. (Kat.Nr. 7-010 C)
- Dextran 250 von Serva (Kat.Nr. 18 694)
- Trypanblau, 0,5 % von Flow-Labs. (Kat.Nr. 7-070 D)
- Dextranblau 2000 von Pharmacia (Kat.Nr. 2163)
- Bromphenolblau von Serva (Kat.Nr. 15375)
- 2-Mercaptoäthanol von Serva (Kat.Nr. 28 625)
- Trichloressigsäure von Merck, Darmstadt (Kat.Nr. 810)
- Toluol von Merck (Kat.Nr. 8325)
- Liquiflour^{R} von New England Nuclear (NEN), Boston, USA
- Polyvinylpyrrolidon (PVP) von Merck, Darmstadt (Kat.Nr. 7443)
- Sephadex G-150 von Pharmacia (Kat.Nr. 2163)
- (6-^{3}H)-Thymidin, spez. Aktivität 2 Ci/mM, von Amersham-Buchler, Braunschweig (Kat.Nr. TRA 306)

* Institut für Mikrobiologie II der Universität Tübingen

3. Weiteres Material

- Milliporefilter Millex, 0,45 µm, von Millipore Corp., Frankfurt
- Falconrohr, 50 ml von Becton, Dickinson, Oxnard, USA (Kat.Nr. 2070)
- Polypropylenröhrchen PPN von Greiner, Nürtingen (Kat.Nr. 2175)
- Mikrotitrierplatten, System Cooke, von Greiner (Kat.Nr. M 220-24 ART)
- Petrischalen für Gewebekultur von Greiner (Kat.Nr. 60/15)
- Glasfaserfilter GF/C von Hormuth + Vetter, Heidelberg
- Polyäthylenzählfläschchen von Zinsser, Frankfurt (Kat.Nr. 714)
- Centriflo^{R}-Membranhülsen von Amicon, Witten (Kat.Nr. CF 50 A)
- Kollodiumhülsen von Satorius, Göttingen (Kat.Nr. SM 132 00)
- Leukopak LP-1 von Fenwal Travenol Laboratories, München

- Hamiltonspritze von Fischer, Frankfurt (TLL, Kat.Nr. 81420, 1002 N)
- Zellkultursammler Skatron A/S von Lierbyen, Norwegen
- Zellkultursammler von Bachhofer, Reutlingen
- Flüssigkeitsszintillationszähler Isocap 300 von Searle Nuclear, Chicago, USA
- Flüssigkeitsszintillationszähler Tricarb Nr. 3375 von Packard Instruments, Frankfurt
- Orthoplan Auflichtmikroskop von Leitz, Wetzlar
- Ultrarac, Uvicord Fraktionssammler von LKB Instrument GmbH, Karlsruhe

III METHODEN

1. Zytologische Methoden

1.1 Lymphozytenkultur

Die Lymphozytenkultur folgte weitgehend der von Oppenheim und Rosenstreich (1976)u. Yamamura (1973) beschriebenen Methodik.

1.1.1 Lymphozytenisolierung

25 ml venöses Spenderblut, gemischt mit Heparin (Liquemin; 25 I.E./ml), wurden nach dem Überschichten einer Ficoll-Isopaquelösung (Lymphoprep) der Dichte 1,077 g/ml im Verhältnis 2 Teile Blut : 1 Teil Gradientenlösung für 30 Minuten bei 18° C mit 800 x g zentrifugiert (Böyum, 1968). Danach wurde das Plasma abpipettiert und durch Erhitzen auf 56° C für 30 Minuten dekomplementiert.

Das Waschen der in der Interphasenschicht angereicherten Lymphozyten erfolgte durch viermaliges Resuspendieren in 50 ml Bikarbonat-gepufferter Hanks-Lösung (HBSS) und jeweiligem Zentrifugieren für 10 Minuten bei 500 x g. Der Lymphozytenanteil der Zellsuspension betrug >85 % und die durch Trypanblauausschluß bestimmte Vitalität lag durchschnittlich bei 95 ± 2 %. Die fertige Zellsuspension enthielt, wenn nicht anders angegeben, 2×10^6 vitale Lymphozyten/ml HEPES gepuffertes TC-199-Medium, ergänzt mit 100 I.E. Penicillin und 100 µg Streptomycin/ml.

1.1.2 Mikrotitrierplattenkultur

Die Kultur der Lymphozyten erfolgte in etwa 2/3 der Untersuchungen in Mikrotitrierplatten.

2×10^5 Lymphozyten in 0.2 ml Medium wurden in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Serum und Mitogen oder Antigen bei 37° C in einer mit 5 % CO_2 angereicherten feuchten Atmosphäre inkubiert. 6 Stunden vor Ende der jeweiligen Kulturzeit erfolgte die Markierung mit 0.22 µCi (6-^{3}H)-Thymidin der spezifischen Aktivität 2Ci/mM (1 µCi/ml Kulturflüssigkeit). Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines multiplen Zellkultursammlers (Skatron) auf Glasfiberfilter abgesaugt, gewaschen und in Polyäthylenzählfläschchen getrocknet. Die Messung der radioaktiven Filter erfolgte in 5 ml Szintillatorflüssigkeit (43 ml Liquifluor in 1 l Toluol) mit Hilfe eines Szintillationszählers Isocap 300. Die Impulse pro Minute (cpm) der einzelnen Kulturansätze wurden als Äquivalent für Aufnahme und Einbau von radioaktivem Thymidin durch die transformierten Lymphozyten gewertet. Die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen wurden um die in den Kontrollansätzen ohne Mitogen oder Antigen gewonnenen cpm-Werte korrigiert. Die Standardabweichung der Mittelwerte lag bei 12 $\pm$ 6 %.

1.1.3 Röhrchenkultur

Diese Methode wurde etwa in 1/3 der Untersuchungen durchgeführt. Bei den Stimulationsversuchen von Patienten mit Hepatitis (siehe C II 2.) sowie gesunder Spender (siehe C I 1.) wurden 2.5×10^5 Lymphozyten in 0.25 ml Medium inkubiert, das 15 % Normalserumpool (NS-Pool) sowie 0, 2, 10 oder 50 µg Phytohämagglutinin-P (PHA-P) enthielt. Nach 66 Stunden Kulturdauer erfolgte die Markierung mit 0.27 µCi (6-^{3}H)-Thymidin (1 µCi/ml). Nach Absaugen der Zellen auf Glasfaserfilter GF/C mit Hilfe eines Zellkultursammlers und Waschen mit 5 % Trichloressigsäure sowie 90 % Äthanol wurden die Filter getrocknet und in 10 ml Szintillatorflüssigkeit im Flüssigkeitsszintillationszähler Tricarb 3375 gemessen.

Ein charakteristisches Beispiel einer Dosiswirkungskurve mit dem Mitogen PHA zeigt, daß bei einer Konzentration von 10 - 30 µg/ml maximal ^{3}H-Thymidin eingebaut wurde (Abb. 1).

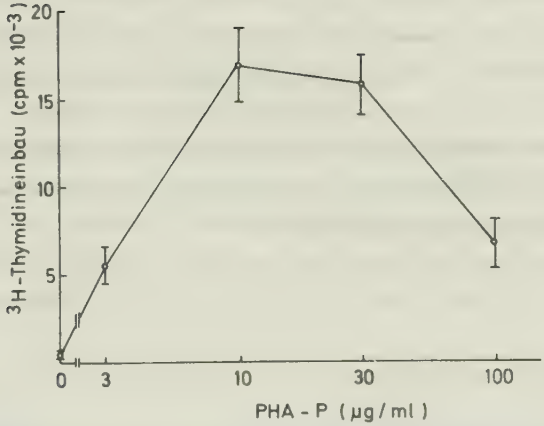


Abb. 1 PHA-Dosiswirkungskurve nach Kultur der Lymphozyten mit der Röhrchenmethode. 2.5 x 10^5 Lymphozyten eines gesunden Spenders wurden in 0.25 ml Medium unter Zusatz von 15 % NS-Pool und verschiedenen Konzentrationen von PHA-P/ml 72 Stunden in Polypropylenröhrchen kultiviert. 6 Stunden vor Ende der Kultur wurden 0.27 µCi ^{3}H-Thymidin zugesetzt. Mittelwerte von drei Parallelansätzen ($\bar{x} \pm$ SD) sind eingezeichnet.

Ein Teil der Seruminhibitionsfaktoren (SIF)-Bestimmungen erfolgte nach der Röhrchenmethode, wobei die Inkubationsdauer 96 Stunden betrug (siehe C II 1.). Gegenüber den Befunden im Standardtest nach nur 48 Stunden Inkubationszeit ergaben sich mit dieser Methode keine unterschiedlichen Ergebnisse (siehe C I 5).

Weil bei den Stimulationstesten mit Staphylokokkenprotein A (Abb. 4) und PPD-Tuberkulin (Abb. 5) mit 1 x 10^6 Lymphozyten gearbeitet wurde, erfolgte die Kultur in Röhrchen.

1.2 Bestimmung von Seruminhibitionsfaktoren (SIF)

Lymphozyten von 2 gesunden Spendern mit guter PHA-Stimulierbarkeit wurden 48 Stunden in Mikrotitrierplatten stimuliert (Standardtest). Jeder Kulturansatz enthielt 2×10^5 Lymphozyten, 10 µg PHA/ml, 10 % Normalserum und in einer Konzentration von 20 % die zu testenden Patientenseren oder Kontrollseren. Die positiven Kontrollen wurden durchgeführt mit 3 Normalseren: Normalserumpool (NS-Pool, NS-1), autologes Plasma des jeweiligen Lymphozytenspenders (NS-2) sowie ein homologes Normalserum (NS-3).

1.2.1 Ermittlung des Inhibitionsindex

Zur Berechnung des Inhibitionsindexes wurde der ^{3}H-Thymidineinbau stimulierter Lymphozyten in Gegenwart eines getesteten Patientenserums mit der Reaktion bei Zusatz von Normalserum verglichen:

$$\text{Inhibitionsindex} = \frac{\text{cpm nach Lymphozytenstimulation in Gegenwart von Testserum}}{\text{cpm nach Lymphozytenstimulation in Gegenwart von Normalserum}}$$

Für jedes Testserum wurden drei Indizes, bezogen auf die mitgetesteten Normalseren (NS-1, 2, 3), errechnet. Da Lymphozyten von zwei Spendern verwendet wurden, stützte sich der Seruminhibitionsindex für die einzelnen Patientenseren auf einen Mittelwert von 6 Indizes, der verwertet wurde, wenn die Standardabweichung < 0.12 war.

Bei allen Testen wurden zwei bis drei definierte unterschiedlich stark hemmende Seren als positive SIF-Kontrolle mitgetestet. Um Nährstoffmangel als Ursache der Hemmung auszuschließen, wurden Kulturansätze mit Medium anstelle des Testserums pipettiert, d.h. die Stimulation der Lymphozyten in 10 % NS bestimmt, und das Ergebnis mit der Reaktion bei Zusatz von 20 % Patientenserum verglichen (siehe Abb. 15) (Nachweis einer aktiven Hemmung).

Ferner wurden gleiche Kulturansätze auf derselben Mikrotitrierplatte (Pipettierkontrolle) sowie die Kontrollansätze auf jeder weiteren Platte wiederholt.

1.2.2 Normal-Index und Aktivitätsgrade

Der Mittelwert der Inhibitionsindizes von 40 Seren gesunder Spender, bezogen auf die Stimulation bei Zusatz von Normalserum-Pool (NS-Pool), lag bei 0.95 ± 0.26 und wurde als Normal-Index bezeichnet. Für die SIF-positiven Seren wurden 5 Aktivitätsgrade gebildet, wobei Indexwerte über 1.0 (z.B. stimulierende Faktoren) nicht berücksichtigt wurden (Tabelle 3).

Tabelle 3 SIF-Aktivitätsgrade

Aktivitätsgrad	Inhibitionsindex	Hemmung
0	> 0.7	keine Hemmung
I	0.5 - 0.65	schwache Hemmung
II	0.3 - 0.45	eindeutige Hemmung
III	0.1 - 0.25	starke Hemmung
IV	< 0.1	sehr starke Hemmung

1.2.3 Reproduzierbarkeit des Testsystems

Der für SIF-positive Seren charakteristische Inhibitionsbereich war reproduzierbar, unabhängig von den jeweils im Test verwandten Lymphozyten. Die Streubreite der mittleren Inhibitionsindizes von vier wiederholt getesteten Seren mit unterschiedlicher SIF-Aktivität lag < 0.15 (Tabelle 4).

Tabelle 4 Reproduzierbarkeit des SIF-Nachweises

Serum	mittlerer Index ($\bar{x} \pm SD$)	Anzahl Teste (n)
1	0.09 ± 0.06	15
2	0.23 ± 0.11	9
3	0.41 ± 0.14	6
4	0.60 ± 0.12	5

1.2.4 Normalseren

Bei den einzelnen Untersuchungsreihen wurde jeweils ein Pool von Seren 4 - 5 gesunder Spender verwendet (Normalserum-Pool, NS-Pool), von dem sterile 1 ml Proben bei - 20° C gelagert wurden.*

1.2.5 Standardseren

Bei den Untersuchungen über die Eigenschaften SIF-positiver (SIF^+) Seren (siehe C III) wurden 22 Seren mit unterschiedlicher SIF-Aktivität verwandt (Tabelle 5).

11 Seren stammten von Patienten mit unkompliziert verlaufender akuter Virushepatitis (AVH), 11 weitere von Patienten mit histologisch gesicherter CAH.

Da sich bei den Untersuchungen über die Eigenschaften SIF^+-Seren keine Unterschiede zwischen den Seren von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis nachweisen ließen, konnten für die unterschiedlichen Aktivitätskontrollen Seren aus beiden Krankheitsgruppen gleichermaßen verwendet werden.

* Ein Teil der Seren (Blutgruppe AB) stellte das Institut für Anaesthesie und Transfusionswesen mit Blutbank der Universität Tübingen freundlicherweise zur Verfügung.

Tabelle 5 SIF-Aktivität von 22 Standardseren

SIF-Aktivität	Inhibitionsindex ($\bar{x} \pm SD$)	Anzahl Seren	Seren von Patienten mit AVH oder CAH
SIF-0	0.83 ± 0.07	4	2 / 2
SIF-I	0.62 ± 0.11	3	3 / 0
SIF-II	0.37 ± 0.05	5	1 / 4
SIF-III	0.18 ± 0.06	9	5 / 4
SIF-IV	0.08	1	0 / 1

1.3 Einfluß SIF^+ Seren auf in vitro Lymphozytenfunktionen

Auch bei diesen Untersuchungen wurde dem Testsystem 20 % SIF^+ Serum zugesetzt, wobei das Kulturmedium als Nährstoffquelle bereits 10 % Normalserum enthielt.

1.3.1 Lymphozytenstimulation im Vollblut

Hierbei wurden 20 µl mit Heparin versetztes peripheres Blut in 200 µl (Verdünnung 1 : 10) Medium 3 Tage in Mikrotitrierplatten stimuliert (Luquetti und Janossy, 1976). Ein charakteristisches Ergebnis einer Lymphozytenstimulation mit 2, 10 und 50 µg PHA/ml ist in Abb. 2 dargestellt und zeigt bei 10 µg PHA/ml den höchsten ^3H-Thymidineinbau.

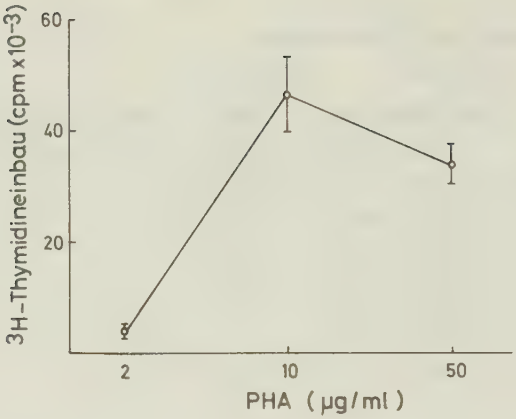


Abb. 2 Konzentrationsabhängige PHA-Stimulation (72 Stunden) von 1 : 10 verdünntem heparinisierten Blut eines gesundes Spenders (Mikrotitrierplattenkultur). Mittelwerte ($\bar{x} \pm SD$) des ^{3}H-Thymidineinbaus von 3 Kulturansätzen sind eingezeichnet.

1.3.2 Spontane Lymphozytenproliferation

Bei der Bestimmung der spontanen Proliferation wurden entweder 2×10^5 isolierte Lymphozyten oder 20 µl heparinisiertes Blut in 200 µl Medium mit 0.22 µCi ^{3}H-Thymidin 8 Stunden inkubiert und anschließend nach der Mikrotitrierplattenmethode aufgearbeitet.

1.3.3 Mitogen induzierte Lymphozytenproliferation

Die Lymphozytenstimulation mit den Mitogenen Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (ConA) (Serva), Limabohnenlektin (Lima) sowie Pokeweedmitogen (PWM)erfolgte nach der Mikrotitrierplattenmethode (siehe 1.1.2), die Stimulation mit Staphylokokkenprotein A (SPA) in Röhrchen. Charakteristische Dosiswirkungskurven in Gegenwart von Normalserum sind für die fünf Mitogene in den Abb. 3 und 4 dargestellt.

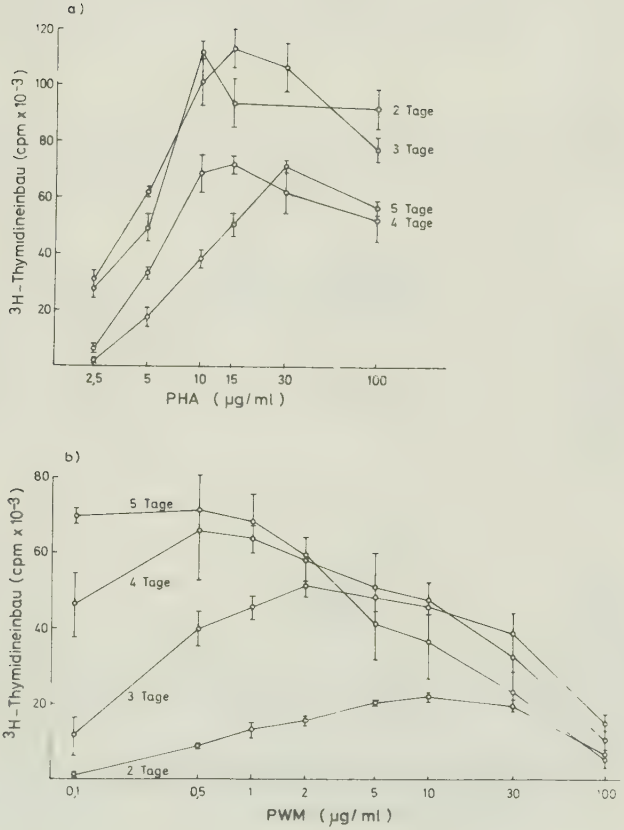


Abb. 3 Dosiswirkungskurven 2, 3, 4 und 5 Tage nach Stimulation von 2×10^5 Lymphozyten eines gesunden Spenders mit 2.5 - 100 µg PHA/ml (a) bzw. 0.1 - 100 µg PWM/ml (b) (Mikrotitrierplattenkultur). Mittelwerte ($\bar{x} \pm SD$) des ^{3}H-Thymidineinbaus von 3 Kulturansätzen sind angegeben.

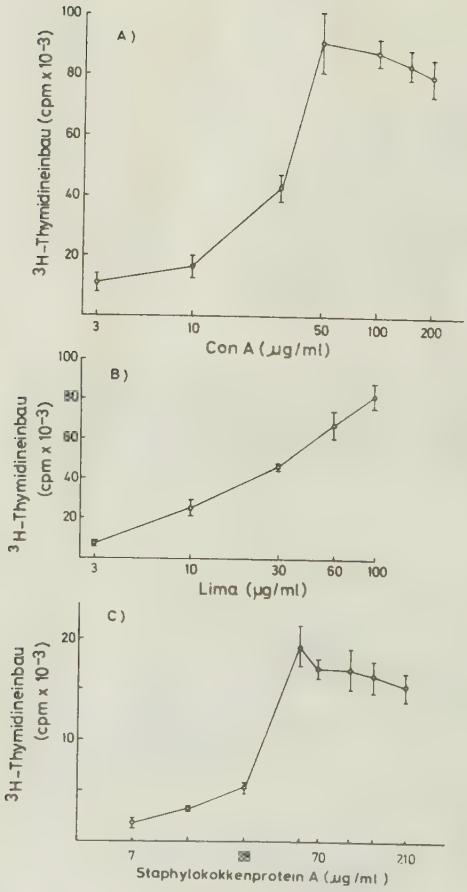


Abb. 4 Dosiswirkungskurven nach 3-tägiger Stimulation normaler Lymphozyten mit Concanavalin A (ConA), Limabohnenlektin (Lima) (Mikrotitrierplattenkultur) und Staphylokokkenprotein A (SPA) (Röhrchenkultur) als Mitogene. Mittelwerte ($\bar{x} \pm SD$) des ^{3}H-Thymidineinbaus von 3-fach Bestimmungen sind angegeben.

Für PHA lag der maximale ^{3}H-Thymidineinbau nach 2 - 5 Tagen Kultur zwischen 10 - 30 µg Mitogen/ml (Abb. 3 a). Dagegen war die Lymphozytenstimulation durch PWM auch von der Länge der Kultur abhängig. Höchste ^{3}H-Thymidineinbauraten wurden nach 2 Tagen in einer PWM-Konzentration von 30 µg/ml, nach 3 Tagen bei 2 µg/ml, nach 4 - 5 Tagen bei 0,5 µg PWM/ml gefunden, d.h. es bestand ein reziprokes Verhältnis von Stimulationsdauer und PWM-Konzentration (Abb. 3 b).

Für ConA wurde die höchste ^{3}H-Thymidinaufnahme bei Inkubation von 3 Tagen bei 50 µg/ml, für Lima bei 100 µg/ml und für SPA bei 56 µg/ml gemessen (Abb. 4).

Bei Stimulation mit SPA, Staphylokokkenprotein A, gekuppelt an Sepharose CL-4B, wurden 1 x 10^{6} Lymphozyten in 1 ml Medium in Polypropylenröhrchen 3 Tage kultiviert und während der letzten 18 Stunden mit 1 µCi ^{3}H-Thymidin markiert (Forsgren et al., 1976).

1.3.4 PPD induzierte Lymphozytenproliferation

Die Dosiswirkungskurve nach einer Stimulation von 1 x 10^{6} Lymphozyten eines Tuberkulin-positiven Spenders in Polypropylenröhrchen mit 12.5 - 100 µg PPD/ml zeigt den höchsten ^{3}H-Thymidineinbau bei einer Konzentration von 50 µg/ml (Abb. 5). Die 0.1 % (w/v) Stammlösung von PPD-Tuberkulin wurde vor Verwendung 24 Stunden gegen HEPES-gepufferten Hanks-Puffer dialysiert und anschließend sterilfiltriert.

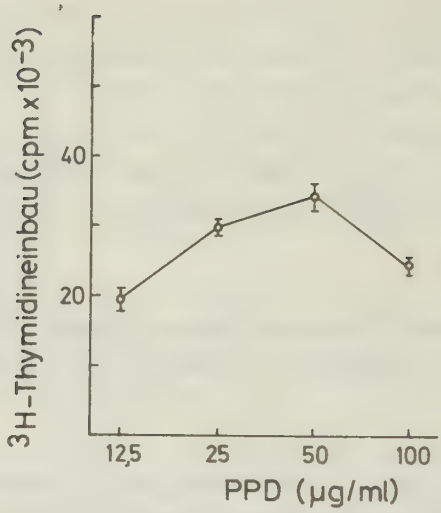


Abb. 5 Dosiswirkung nach Stimulation normaler Lymphozyten eines Tuberkulin-positiven Spenders mit 12.5 - 100 µg PPD/ml über 5 Tage (Röhrchenkultur). Angegeben sind die Mittelwerte ($\bar{x} \pm SD$) des ^{3}H-Thymidineinbaus von 3 Parallelansätzen.

1.3.5 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

In einer Modifikation der von Yamamura et al. (1976) beschriebenen Methode wurden je 1×10^5 Lymphozyten von zwei nicht verwandten, gesunden Spendern als Zwei-Weg-MLR in Gegenwart von 20 % (bzw. 7 %) Serum (SIF^+ oder Normalserum) 120 Stunden in Mikrotitrierplatten kultiviert, wobei 18 Stunden vor Beendigung der Stimulation 0.22 µCi ^{3}H-Thymidin zugegeben wurde.

1.3.6 Leukozytenmigrationshemmung

Die von Ax und Tautz (1974) modifizierte Methode der Leukozytenmigration unter Agarose nach Clausen (1971) wurde angewendet. Heparinisiertes Blut von einem Tuberkulin-positiven und Tuberkulin-negativen Spender wurde mit 5 % Dextran-250-Lösung in Bikarbonat-gepuffertem Hanks-Puffer im Verhältnis 4 : 1 gemischt. Nach 60 Minuten Sedimentation bei 37° C erfolgte ein 3-maliges Waschen der im Überstand angereicherten Leukozyten in Bikarbonat-gepuffertem Hanks-Puffer. Die auf Vitalität geprüften Zellen (Trypanblauausschluß) wurden nach Auswertung eines Differentialblutbildes auf eine Konzentration von 2×10^8 polymorphkernige Granulozyten/ml in HEPES-gepuffertem Dulbeccos Modifikation von Eagles Medium eingestellt, das 4 mM Glutamin, Penicillin/Streptomycin (100 I.E./ 100 µg/ml), 1.8 g Polyvinylpyrrolidon/100 ml sowie 10 E Heparin/ml enthielt.
Anschließend erfolgte eine zweistündige Vorinkubation bei 37° C von 25 µl Leukozytensuspension (mit 5×10^6 Granulozyten und je nach Spender ca. 2×10^6 Lymphozyten) mit 15 µl Serum (Normalserum oder Testserum) und 10 µl dialysierter PPD-Tuberkulinlösung (100 µg/ml) bzw. 10 µl Medium.

Zur Herstellung von Agaroseschalen wurden 1.2 g Agarose in 45 ml Aqua dest. gelöst, nach Abkühlung auf 45° C mit 45 ml doppelt konzentriertem Medium und 10 ml autologem Serum gemischt, je 5 ml dieser Lösung in eine Petrischale für Gewebekultur gegossen und nach Erstarren des Agars 8 Löcher gestanzt (Ø = 2.5 mm).

Nach der zweistündigen Inkubation der Leukozyten wurden von jeder Suspension (mit und ohne Antigen) vier Portionen (je 10 µl) in die Löcher der Agaroseschalen eingefüllt und 18 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit absolutem Methanol 10 Minuten lang und mit 40 % Formalin 40 Minuten lang fixiert. Nach Abheben der Agarose erfolgte eine Pappenheim-Färbung der unter der Agaroseschicht ausgewanderten Zellen. Die Größe der Migrationshöfe wurde durch Projektion auf Papier und Wiegen der Flächen bestimmt.
Aus dem Vergleich der Migrationsflächen mit und ohne PPD-Zusatz wurde der Migrationsindex berechnet. Eine positive Reaktion wurde bei einem Index von < 0.75 angenommen.

$$\text{Migrationsindex} = \frac{\text{„Fläche der Migrationshöfe (Mittelwert) mit PPD}}{\text{Fläche der Migrationshöfe (Mittelwert) ohne PPD}}$$

Die Bestimmung des Einflusses SIF^+ Standardseren auf die PPD induzierte Migrationshemmung erfolgte durch Vergleich der mit Kontrollserum gewonnenen Wanderungshemmung mit der Reaktion in Gegenwart von SIF^+ Serum.

Der Einfluß SIF^+ Seren auf die Wanderung der Leukozyten wurde dadurch getestet, daß diese Seren der Leukozytensuspension ohne PPD zugesetzt und die Migration mit der Kontrolle verglichen wurde.

1.3.7 E-Rosettentest

Nach der von Chisari und Edgington (1975) beschriebenen Methode zum Nachweis von E-Rosetten inhibierenden Serumfaktoren erfolgte eine 18-stündige Vorinkubation von je 2×10^5 normaler Lymphozyten in 0.2 ml mit 50 µl Serum (SIF^+ Serum oder Normalserum) in Polypropylenröhrchen mit anschließendem dreimaligen Waschen der Lymphozyten und Resuspension in 0.1 ml Medium. 0.1 ml der vorbehandelten 2×10^5 Lymphozyten und 0.1 ml einer 0.5 %-igen 3-mal in Hanks-Puffer gewaschenen Hammelerythrozyten-(E)-Suspension (ungefähr 8×10^6 Erythrozyten) wurden in einem Verhältnis von Lymphozyt : Erythrozyten = 1 : 40 nach 15-minütiger Inkubation bei 37° C für 5 Minuten bei 150 x g und 4° C zentrifugiert und anschließend 24 Stunden bei 4° C inkubiert. Nach Zufügen von 0.1 ml eiskalter 0.5 %-iger Trypanblaulösung und vorsichtigem Resuspendieren der Zellen erfolgte das Auszählen von 200 Lymphozyten in einer Neubauer-Zählkammer. Als E-Rosette wurden Lymphozyten gewertet, an denen mindestens drei Erythrozyten gebunden waren.
Der Einfluß von SIF^+ Serum auf die T-Rosettenfunktion wurde durch Vergleich der Rosettenbildung der mit SIF^+ Serum und der mit Normalserum (AB) vorbehandelten Lymphozyten bestimmt. Betrug die Rosettenbildung bei Zusatz eines Testserums <80 % der Kontrolle in Normalserum, wurde eine Hemmung angenommen.

1.3.8 Mitogen induzierte Proliferation von Mäuselymphozyten

Der Versuch wurde parallel mit Lymphozyten von zwei 6 Wochen alten C3H-Mäusen durchgeführt. Nach Zerschneiden und Homogenisieren der Milzen in 15 ml MEM-Medium wurden Gewebeteile und Zellaggregate über Nylonwolle (Leukopak) abfiltriert und die Milzzellen zweimal in 50 ml MEM gewaschen (Zentrifugation bei 250 x g). Nach Vitalitätsprüfung mit Trypanblau wurden die Zellen in einer Konzentration von 4×10^6 Lymphozyten/ml in RPMI 1640 resuspendiert unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin (100 I.E./ml und 100 µg/ml), 2-Mercaptoäthanol (5×10^{-5} M), Glutamin (2 mM/ml) und 10 % dekomplementiertem Humanserum (Flow Laboratories).

4×10^5 Lymphozyten wurden unter Zusatz von 20 % Serum (SIF^+ Serum oder Normalserum) mit 2, 10, 50 µg ConA/ml (Difco Labs.) bzw. mit 4, 20 und 100 µg LPS/ml stimuliert. Die 3-Tage-Kultur erfolgte in Mikrotitrierplatten, die Markierung mit 1 µCi ^{3}H-Thymidin/ml in den letzten 18 Stunden, anschließend Aufarbeitung wie in der Mikrotitrierplattenmethode (siehe 1.1.2). Der ^{3}H-Thymidineinbau der stimulierten Mäuselymphozyten in Normalserum ist in Abb. 6 dargestellt. Die optimale Mitogenkonzentration lag für ConA bei 50 µg/ml, für LPS bei 20 µg/ml.

1.4 Kultur von Ehrlich Ascites Tumorzellen

Die in NMRI-Mäusen passagierten Ascites Tumorzellen wurden 7 Tage nach Inokulation gewonnen, zweimal in RPMI gewaschen und nach Vitalitätsprüfung mit Trypanblau auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml mit RPMI eingestellt, dem 100 I.E. Penicillin/ml und 100 µg Streptomycin/ml zugesetzt waren. Die Kultur erfolgte mit 1×10^5 Tumorzellen unter Zusatz von 10 % oder 20 % Serum (SIF^+ oder Normalserum) für 24 Stunden; während der letzten 4 Stunden wurden 1 µCi ^{3}H-Thymidin/ml zugefügt. Die Bestimmung des Einflusses SIF^+ Standardseren auf die Proliferation der Tumorzellen erfolgte durch Vergleich der ^{3}H-Thymidinaufnahme bei Kultur in SIF^+ Serum und Normalserum.

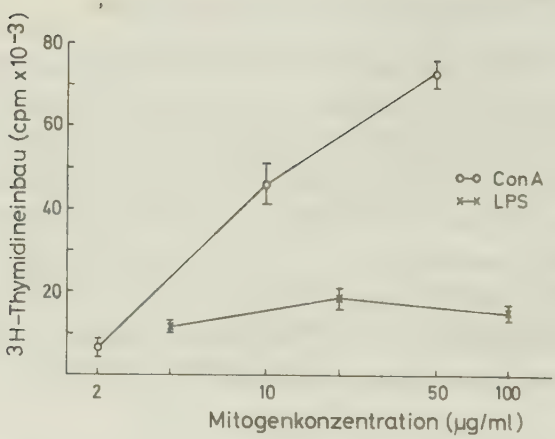


Abb. 6 3-Tage-Stimulation von 4×10^5 Lymphozyten aus einer C3H-Maus mit verschiedenen Konzentrationen von ConA (o—o) bzw. LPS (x—x) unter Zusatz von 20 % Normalserum. Mittelwerte ($\bar{x} \pm SD$) des ^3H-Thymidineinbaus von 3 Parallelansätzen sind eingezeichnet.

2. Bestimmung von Serumproteinen

2.1 Nachweis von HBV-Antigenen, -Antikörpern und anti HA-Antikörpern

Die Bestimmung von HB_sAg und anti-HB_s erfolgte in unserem Labor mit Hilfe des Radioimmunoassays AUSRIA-II-125 bzw. AUSAB von Abbot Laboratories, die anti-HB_c-Antikörper wurden in einem Radioimmunoassay freundlicherweise von Herrn Dr. W. Gerlich, Nationales Referenzzentrum für Virushepatitis, Hygieneinstitut der Universität Göttingen, bestimmt und e-Antigen und anti-e Antikörper wurden mit Hilfe der Immundiffusion nachgewiesen. Radioimmunologische anti-HA-Antikörper-Bestimmungen wurden freundlicherweise von Dr. B. Flehmig, Hygieneinstitut Tübingen, durchgeführt.

2.2 Nachweis von Autoantikörpern

Der Nachweis von Antikörpern gegen Kerne (ANA) und glatte Muskulatur (SMA), mitochondrialen Antigenen (AMA) sowie Gefäßendothel erfolgte nach der Methode von Coons im Rahmen von Routinetesten. Nach Inkubation der Schnitte von menschlicher Niere und Schilddrüse, Rattenmagen, -leber sowie -niere mit den 1 : 10 verdünnten Seren, Waschen mit Veronalpuffer, Überschichten mit Fluorescein-konjugiertem Globulin gegen Humanglobulin G, M, A von der Ziege (1 : 15 verdünnt) und erneutem Waschen erfolgte die Auswertung der Schnitte im Universal-Auflichtmikroskop Orthoplan bei Sperrfilter S 525, Erregerfilter KP 500 und BG 38.

2.3 Nachweis von α_2-Makroglobulin

Die Konzentrationsbestimmung von α_2-Makroglobulin erfolgte mit Hilfe von LC-Partigenplatten von Behring (Mancini-Methode). Dabei wurde nach 50-stündiger Diffusion bei 18° C die Präzipitationshöfe der 1 :2 verdünnten Testseren sowie der Standardseren mit bekannter α_2-Makroglobulinkonzentration ausgemessen, und die Makroglobulinkonzentration mit Hilfe einer Eichkurve aus den Werten der Standardseren ermittelt.

2.4 Nachweis von Immunkomplexen

Die Immunkomplexbestimmung erfolgte nach der Polyäthylenglykol-Methode von Zubler et al. (1977). 0.1 ml Serum wurde zu 20 µl Polyäthylenglykol-Lösung (12 % Polyäthylenglykol 6 000 in Veronalpuffer/EDTA) pipettiert, über Nacht bei 4° C inkubiert und 20 Minuten bei 1 000 x g und 4° C zentrifugiert. Nach Waschen des Präzipitates mit 2 % Polyäthylenglykol und Resuspension in 0.1 ml physiologischer NaCl-Lösung erfolgte die IgG-Bestimmung in LC-Partigenplatten (vergl. α_2-Makroglobulin-Nachweis).

2.5 Nachweis von Serumproteinen durch Immunelektrophorese

10 µl Serum oder Serumfraktion wurde in die Stanzlöcher eines 1 % Agarosegels (HSA, Litex, in 75 mM Veronalpuffer) eingefüllt und bei 100 V und 36 mA pro Gelbett aufgetrennt, bis die mit Bromphenolblau markierte Albuminbande eines Kontrollserums 3.5 cm von der Auftragsstelle gewandert war. In einem zweiten Schritt diffundierte ein Antiserum gegen Humanserum (von der Ziege) aus den parallel zur Wanderungsrichtung ausgehobenen Rillen 48 Stunden lang bei 18° C. Anschließend wurde das Gel auf Präzipitationslinien durch Vergleich mit Kontrollseren ausgewertet und photographiert.

2.6 Nachweis anderer Serumproteine

Eine Reihe von Seren wurde freundlicherweise von Dr. A. L. W. F. Eddleston, Liver-Unit, King's College Hospital, London, radioimmunologisch auf Antikörper gegen leberspezifisches Lipoprotein (anti-LSP-Antikörper) untersucht, von Dr. F. Schunter, Medizinische Klinik Tübingen, im Mikrozytotoxizitätstest auf lymphozytotoxische Antikörper sowie von Dr. R. Fleischmann, Medizinische Klinik Tübingen, radioimmunologisch (Testkit von Isotopendienst West) auf Alphafetoprotein.
Die Untersuchung auf Antikörper gegen DNS erfolgte in unserem Labor radioimmunologisch mit Hilfe des Testkits von Amersham Buchler.

3. Fraktionierung von Serum

3.1 Molekularfiltration

Durch Zentrifugation der Seren in Centriflo-Membranhülsen für 10 Minuten bei 800 x g und 4° C konnten Substanzen mit einem Molekulargewicht von < 50 000 Dalton von höhermolekularen Substanzen abgetrennt werden.

3.2 Gelfiltration

Vor der gelchromatographischen Fraktionierung der Testseren an einer Sephadex G-150 Säule (3.5 x 90 cm) erfolgte eine Auftrennung eines Proteingemisches, das mit Hanks-Puffer bei 30 ml/Stunde eluiert wurde. Folgende Proteine wurden in einer Konzentration von 5 mg/ml verwandt: Ferritin, Aldolase, Albumin, Chymotrypsin und Cytochrom C (Combithek).

Anschließend wurden das Normalserum und die SIF^+ Standardseren fraktioniert, das Eluat der einzelnen durch Absorption bei 280 nm (Uvicord) ermittelten Peaks vereinigt, durch Druckdialyse in Kollodiumhülsen auf das Auftragsvolumen eingeengt, gegen HEPES-gepuffertes TC-199 dialysiert und durch 0.45 µm Milliporefilter sterilfiltriert.
Die Ermittlung des Molekulargewichtsbereichs der bei allen fraktionierten Seren annähernd gleich gemessenen drei Peaks erfolgte mit Hilfe einer Kurve aus den Werten der Eichproteine. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach Lowry und betrug für den 1. Gipfel bei allen drei Auftrennungen zwischen 14.5 - 18.6 mg/ml, für den 2. Gipfel zwischen 19.5 - 29.1 mg/ml und den 3. Peak zwischen 39.2 - 45.7 mg/ml. In der Immunelektrophorese (siehe III 2.5) wurden anschließend mit Hilfe eines anti-Humanserums die Fraktionen analysiert.

4. Statistische Methoden

Bei vergleichenden Untersuchungen ausreichender Zahl wurde der Unterschied der Mittelwerte ($\bar{x} \pm SD$) statistisch geprüft. Im Falle der Gleichheit der Varianzen wurde ein t-Test nach Student für gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben angewandt. Als Signifikanzniveau wurde $2P < 5\ \%$ festgesetzt.
Mit Hilfe der linearen Regression wurde geprüft, ob eine Korrelation zwischen dem SIF-Index und anderen Serumfaktoren bestand. Aus den paarweisen Messungen wurde der Korrelationskoeffizient r errechnet und gegen 0 getestet.

5. Abkürzungen

AFP	Alphafetoprotein
aHB_c, anti-HB_c	Antikörper gegen HB_cAg
aHB_s, anti-HB_s	Antikörper gegen HB_sAg
ANA	antinukleäre Antikörper; Antikörper gegen Kernantigene
AVH	akute Virushepatitis
B-Lymphozyt, B-Zelle	Bursa-Äquivalent-abhängiger Lymphozyt
CAH	chronisch aktive Hepatitis
CAH II a	inaktive CAH
CAH II b	aktive CAH
CPH	chronisch persistierende Hepatitis
ConA	Concanavalin A
cpm	counts per minutes, Zählimpulse pro Minute
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HA, HAV	Hepatitis A, Hepatitis A-Virus
HB, HBV	Hepatitis B, Hepatitis B-Virus
HB_cAg	Core-Antigen des HBV
HB_sAg	Oberflächen(Surface)-Antigen des HBV
IRA	Immunregulatives α-Globulin
LAP	Laparaskopie
LB	Leberbiopsie
LC	Leberzirrhose
Lima	Limabohnenlektin
LPS	Lipopolysaccharid
LSP	Leberspezifisches Lipoprotein
MG	Molekulargewicht
MLR	Gemischte Lymphozytenreaktion
NS	Normalserum, Serum gesunder Spender
NS-Pool	Pool von 4 - 5 Seren gesunder Spender
NP	Normalperson, gesunde Spender

PHA	Phytohämagglutinin
PPD	Tuberkulin (purified protein derivate)
PWM	Pokeweedmitogen
RIF	Rosetteninhibitionsfaktor
SIF, SIF^+	Seruminhibitionsfaktor, SIF-positives Serum
SPA	Staphylokokkenprotein A
SMA	Antikörper gegen glatte Muskulatur (smooth muscle antibodies)
T-Lymphozyt, T-Zelle	Thymus-abhängiger Lymphozyt
$\bar{x} \pm SD$	Mittelwert und Standardabweichung

C ERGEBNISSE

I UNTERSUCHUNGEN ZUR STANDARDISIERUNG DES SERUMINHIBITIONS-FAKTOREN (SIF)-NACHWEISES

1. Bedeutung der unterschiedlichen Stimulierbarkeit normaler Lymphozyten durch PHA

Lymphozyten von 25 gesunden Spendern wurden mit einer niedrigen (2 µg/ml), mittleren (10 µg/ml) und hohen (50 µg/ml) Konzentration von Phytohämagglutinin (PHA) in Gegenwart von 15 % Normalserum (NS-Pool) 3 Tage in einer Röhrchenkultur stimuliert.

Die Ergebnisse von 48 Stimulationstesten sind in Abb. 7 zusammengefaßt. Die Mittelwerte des ^{3}H-Thymidineinbaus lagen für 2 µg/ml bei 7 870 $\pm$ 5 450 cpm, für 10 µg/ml bei 19 060 $\pm$ 7 890 und für 50 µg/ml bei 10 790 $\pm$ 6 520 cpm. Die große Streubreite der Mitogenstimulation zeigt sich an den hohen Standardabweichungen, die für 2 µg 69 %, für 10 µg 41 % und für 50 µg 60 % vom Mittelwert betrugen.

Deutliche Schwankungen der Intensität der Stimulation ergaben sich auch für einzelne Lymphozytenspender, wenn sie in einem Zeitraum von 6 Monaten wiederholt getestet wurden. Bei dem in Abb. 8 angegebenen Beispiel fanden sich die größten Unterschiede bei der Konzentration von 10 µg PHA/ml.

In Abb. 9 ist die unterschiedliche Stimulierbarkeit der Lymphozyten von 6 gesunden Spendern dargestellt, wobei der mittlere ^{3}H-Thymidineinbau von 5 Stimulationstesten bei Lymphozytenspender 1 mehr als doppelt so hoch lag wie bei Spender 6 ($P < 0.05$).

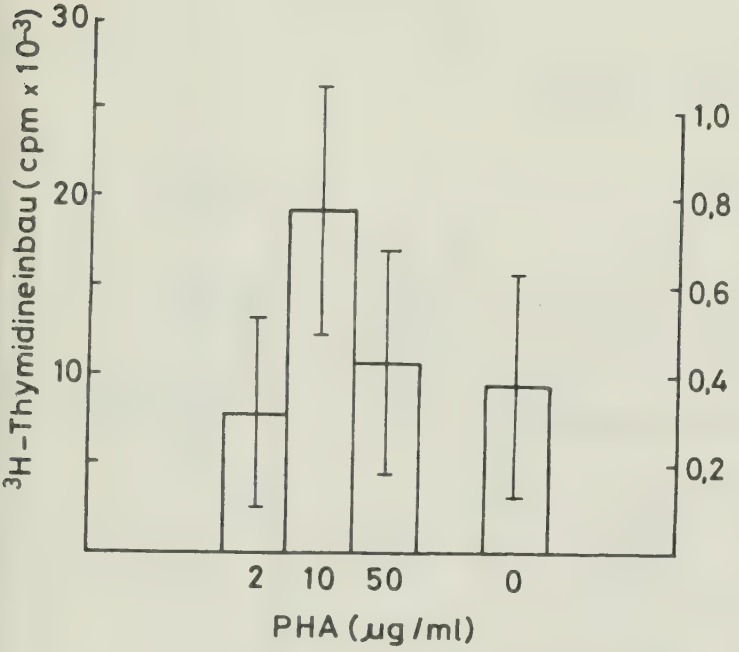


Abb. 7 PHA-induzierte Lymphozytenproliferation bei 25 gesunden Spendern in Abhängigkeit von der Konzentration. 3-Tage Röhrchenkultur in Gegenwart von 15 % Normalserum (siehe Legende Abb. 3; B III 1.1). Mittelwerte ($\bar{x} \pm SD$) des ^{3}H-Thymidineinbaus von 48 Stimulationstesten.

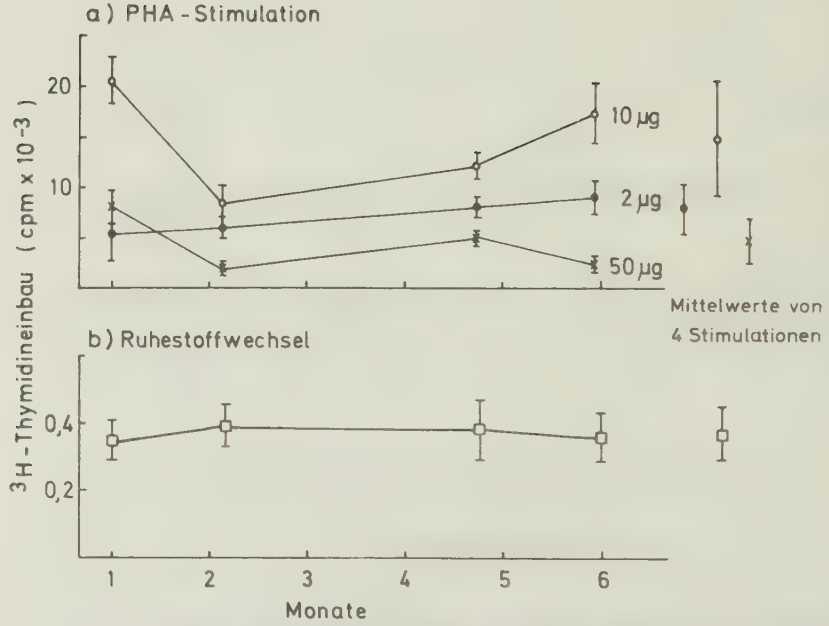


Abb. 8 a) Wiederholte Stimulation der Lymphozyten eines gesunden Spenders im Ablauf von 6 Monaten mit 2 µg PHA/ml (• —— •), 10 µg/ml (o —— o) und 50 µg/ml (x —— x). ^{3}H-Thymidineinbau ($\bar{x}$ + SD) nach 3 Tagen Kultur (Röhrchenmethode, siehe Abb. 3, B III 1.1). In der Abbildung rechts sind die Mittelwerte der 4 Teste angegeben.

b) Verhalten des Ruhestoffwechsels.

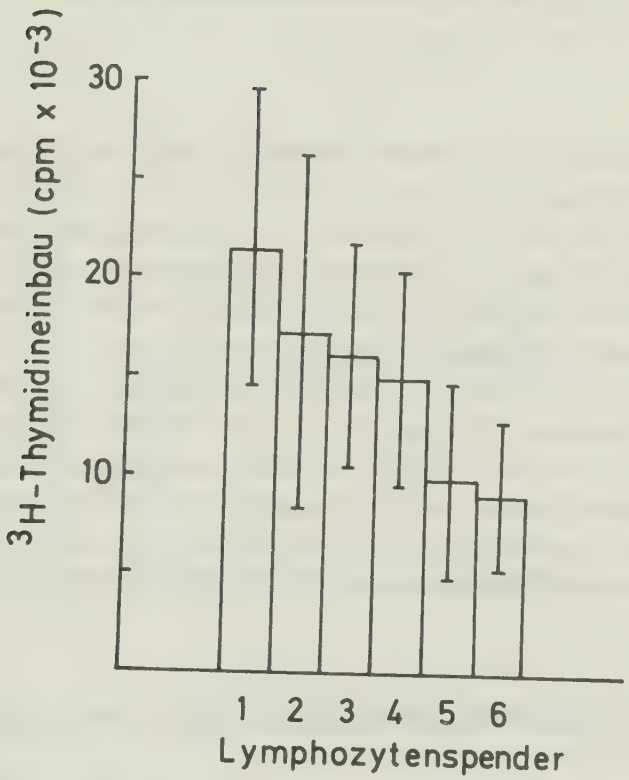


Abb. 9 Lymphozytenreaktivität von 6 wiederholt getesteten gesunden Spendern mit 10 µg PHA/ml. Mittelwerte ($\bar{x}$ + SD) des ^{3}H-Thymidineinbaus von 4 - 5 Stimulationsversuchen (3-Tage Röhrchenkultur; siehe Abb. 3, B III 1.1).

Aus diesen unter einheitlichen Kulturbedingungen durchgeführten Untersuchungen geht hervor, daß die erhebliche Variabilität der Mitogenstimulierbarkeit gesunder Spender sowohl von individueller Reaktivität auf das Mitogen PHA als auch vom Zeitpunkt der Untersuchung abhängt.

Für den Nachweis von Seruminhibitionsfaktoren (SIF), die die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation hemmen, (siehe B III 1.2) hat jedoch die unterschiedliche Stimulierbarkeit normaler Lymphozyten nur untergeordnete Bedeutung. Wie Abb. 10 a zeigt, verringerte sich der ^{3}H-Thymidineinbau durch Zusatz SIF-positiver Seren sowohl bei gut stimulierbaren wie auch schwächer stimulierbaren Lymphozyten in Abhängigkeit zur SIF-Aktivität der Seren (siehe B III 1.2.2). Die ermittelten Inhibitionsindizes (siehe B III 1.2.1) stimmten in den meisten Fällen, insbesondere für die stark hemmenden Seren (SIF-Aktivität III und IV), gut überein (Abb. 10 b). Da jedoch die absoluten Unterschiede der ^{3}H-Thymidinaufnahme (cpm) zwischen Kontrolle (NS) und SIF-positiven Seren bei Lymphozytenspender I wesentlich größer waren als bei Spender II, wurden bei den weiteren Untersuchungen 6 Lymphozytenspender mit starker PHA-Reaktivität bevorzugt.

2. Einfluß SIF-positiver Seren auf die Proliferation heterologer Lymphozyten

Um das Testsystem wegen der unterschiedlichen Stimulierbarkeit normaler Lymphozyten besser standardisieren zu können, wurde versucht, Serumhemmfaktoren auch mit heterologen Lymphozyten nachzuweisen. Abb. 11 zeigt, daß stark hemmende Seren nicht nur die Mitogen-induzierte Proliferation autologer (Patient) und homologer (Normalperson) Lymphozyten (Human), sondern auch die Stimulation von Mäuse-, Rinder- und Schafslymphozyten im Gegensatz zur Proliferation von Ehrlich Aszites Tumorzellen unterdrücken.

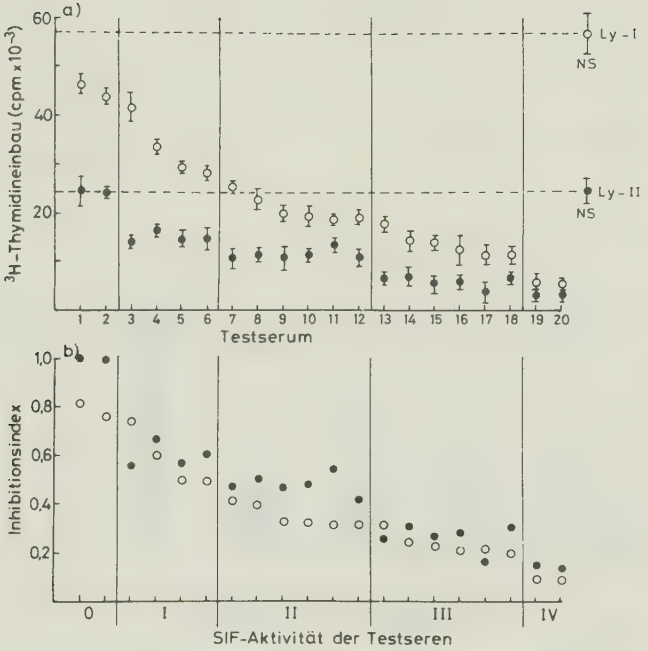


Abb. 10 Vergleich des Nachweises von Seruminhibitionsfaktoren (SIF) in 20 unterschiedlich stark hemmenden Seren mit Lymphozyten eines stark reagierenden (Ly-I, o) und eines schwach reagierenden (Ly-II, •) Spenders. Die Seren sind nach den 5 verschiedenen Aktivitätsgraden geordnet.
Abb. 10 a zeigt den ^{3}H-Thymidineinbau ($\bar{x} \pm SD$),
b die Inhibitionsindizes. Die gestrichelten horizontalen Linien geben die Reaktion der Ly-I und Ly-II in Gegenwart eines NS-Pools an.

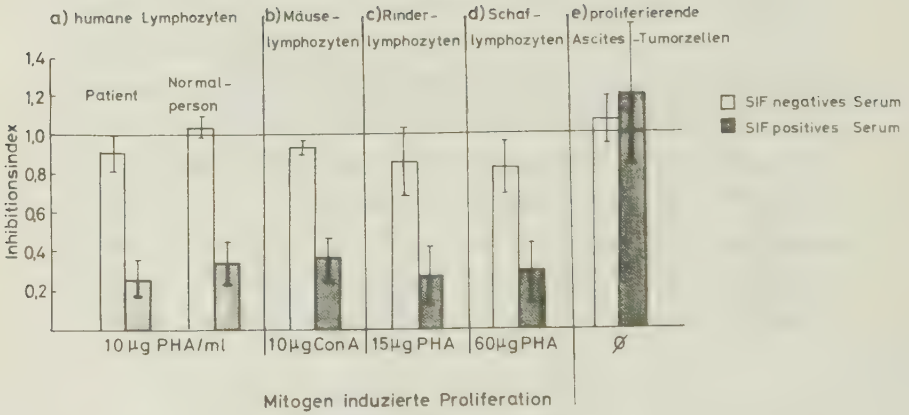


Abb. 11 Einfluß SIF-positiver Seren auf die Proliferation verschiedener Zellen.

a) Inhibitionsindizes ($\bar{x}$ + SD) von 6 SIF^+ Patientenseren (schwarze Säulen) und zwei Normalseren (SIF-negativ; weiße Säulen) beim SIF-Test mit Patienten- (autologen) Lymphozyten sowie Lymphozyten von Normalpersonen.

b) Inhibitionsindizes ($\bar{x}$ + SD) von 2 NS und 4 SIF^+ Seren (SIF-Standardtest: 0.26 + 0.14) nach Stimulation von Mäuselymphozyten mit 10 µg ConA/ml. ^{3}H-Thymidineinbau der Kontrolle: 44 850 + 5 830 cpm (siehe B III 1.3.8).

c) Inhibitionsindizes von 2 NS und 2 SIF^+ Seren nach Stimulation von Rinderlymphozyten mit 15 µg PHA/ml (nach Mikrotitrierplattenkultur; Kontrolle: 42 235 + 5 950 cpm) sowie

d) von Schafslymphozyten mit 60 µg PHA/ml (Kontrolle 6 850 + 1 290 cpm)

e) Einfluß von 7 SIF^+ Seren (SIF-Standardtest 0.28 + 0.07) auf die Proliferation von Ehrlich Aszites Tumorzellen im Vergleich zur Reaktion in NS (SIF-negativ) (Kontrolle: 21 180 + 1 635 cpm; siehe B III 1.4).

3. Einfluß SIF-positiver Seren auf die Lymphozytenvitalität

Um zytotoxische Effekte durch SIF-positive Seren ausschließen zu können, wurde am Ende eines SIF-Testes neben der ^{3}H-Thymidinmessung eine Vitalitätsbestimmung der kultivierten Lymphozyten mit Trypanblau durchgeführt. Aus Tabelle 6 geht hervor, daß kein Unterschied bezüglich der Anzahl vitaler Zellen nach Inkubation mit SIF-positiven und SIF-negativen Seren bestand. Im Gegensatz dazu lag die Blastentransformation durch PHA in Gegenwart der SIF-positiven Seren (SIF-III) signifikant niedriger.

Tabelle 6 Mikroskopische Auswertung nach einer PHA-Stimulation normaler Lymphozyten in Gegenwart SIF-positiver und SIF-negativer Seren

Seren	SIF-Index	% vitale Zellen	% Blasten
Normalseren (n = 2)	0.9 $\pm$ 0.1	84 $\pm$ 2	59 $\pm$ 4
SIF^{+} Seren (n = 5)	0.2 $\pm$ 0.13	81 $\pm$ 3	21 $\pm$ 6
SIF^{-} Seren (n = 3)	0.75 $\pm$ 0.05	85 $\pm$ 4	53 $\pm$ 6

4. Einfluß der PHA-Konzentration auf den SIF-Nachweis

Um zu klären, ob der hemmende Effekt der Patientenseren von der Konzentration des Mitogens in der Kultur abhängt, wurden Dosiswirkungskurven mit PHA als Mitogen erstellt, wobei die Kulturen unterschiedlich stark hemmende Standardseren (n = 8) enthielten.

Die charakterist ische Dosiswirkungskurve der PHA-Stimulation war durch die hemmenden Seren zwar erniedrigt, aber nicht verändert, wie aus den repräsentativen Beispielen in Abb. 12 hervorgeht.

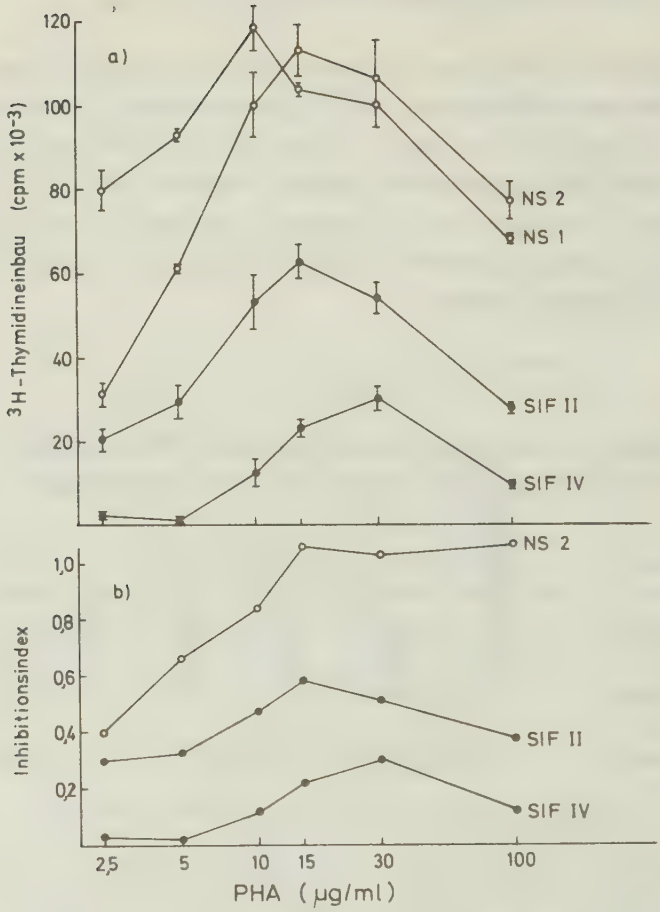


Abb. 12 PHA-Dosiswirkungskurve 3 Tage nach Stimulation der Lymphozyten eines gesunden Spenders (Mikrotitrierplattenkultur mit 10 % NS; B III 1.1.2) bei Zusatz von 20 % NS-Pool (NS 1), homologem NS (NS 2) (o——o) oder je einem hemmenden Serum der Aktivität SIF-II bzw. SIF-IV (●——●).

a) Mittelwerte ($\bar{x}$ + SD) des ^{3}H-Thymidineinbaus,

b) Inhibitionsindizes bezogen auf NS 1.

Eine Erhöhung der Mitogenkonzentration mit maximaler ^{3}H-Thymidinaufnahme wie in der Abbildung bei dem Serum der Aktivität SIF-IV (Gipfel bei 30 µg gegenüber 10 - 15 µg im NS) wurde häufig beobachtet (bei 58 % der insgesamt 43 ermittelten PHA-Dosiswirkungskurven). Nur in 7 Fällen fand sich der höchste ^{3}H-Thymidineinbau bei 100 µg PHA/ml, wobei in vier Fällen die optimale Mitogenkonzentration bei 30 µg/ml lag (Stimulation in NS).

Die Abbildung zeigt ferner, daß eine Hemmung der Stimulation auch bei einer 10-fach erhöhten PHA-Konzentration im Vergleich zur Standarddosis von 10 µg/ml (= 100 µg) gleich stark nachweisbar war. Dieser Befund traf auch bei 31 anderen Dosiswirkungskurven zu und spricht gegen eine Bindung von Mitogen an Proteine des SIF-positiven Serums.

Die Ergebnisse zeigen, daß Seruminhibitionsfaktoren bei Konzentrationen von 10 - 30 µg PHA/ml mit relativ großer Zuverlässigkeit nachgewiesen werden können. Dagegen ist die Verwendung von 2.5 und 5 µg PHA/ml für den Test ungeeignet, da bei diesen niedrigen Mitogendosen die Indizes für Normalseren im hemmenden Bereich liegen können (NS 2).

5. Einfluß der Dauer der Lymphozytenkultur auf den SIF-Nachweis

Da nicht bekannt war, ob die Hemmung der Lymphozytenstimulation durch längere Inkubationsdauer abgeschwächt oder verstärkt wird, wurden Dosiswirkungskurven über einen Zeitraum von 2 - 5 Tagen mit PHA und Pokeweedmitogen (PWM) erstellt. Aus den in Abb. 13 eingezeichneten Inhibitionsindizes für 4 SIF-positive Seren nach Stimulation mit PHA (10 bzw. 30 µg/ml) sowie für 3 Seren bei Verwendung einer niedrigen (0.1 µg) und hohen (50 µg/ml) PWM-Dosis geht hervor, daß die Dauer der Lymphozytenkultur für den SIF-Nachweis keine Rolle spielt.

Insgesamt wurden je 6 Mitogenkonzentrationen und 8 bzw. 6 SIF-positive Seren untersucht, wobei sich nur in wenigen Fällen ein abweichender Befund ergab (in 8 % bei Verwendung von PHA und 17 % von PWM).

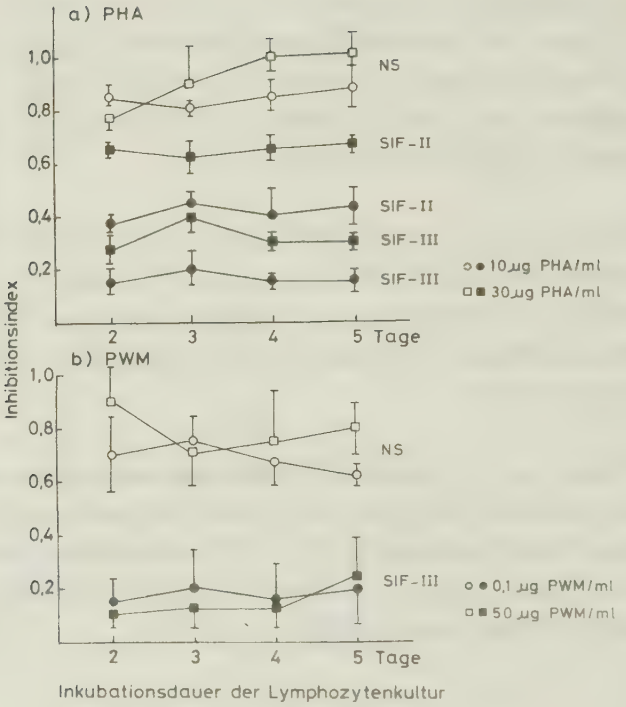


Abb. 13 Hemmung der Mitogenstimulation von Normallymphozyten durch SIF^+ Seren in Abhängigkeit von der Dauer der Kultur (Mikrotitrierplattenkultur mit 10 % NS, B III 1.1.2)
a) Inhibitionsindizes ($\bar{x} \pm SD$), bezogen auf NS-Pool, für 2 NS (offene Symbole), je 2 Seren der Aktivität SIF-II bzw. SIF-III (schwarze Symbole) nach Stimulation mit 10 µg (o , ●) oder 30 µg PHA/ml (□ , ■).
b) Inhibitionsindizes ($\bar{x} \pm SD$) für 2 NS bzw. 3 Seren der Aktivität SIF-III nach Stimulation mit 0.1 µg (o , ●) oder 50 µg PWM/ml (□ , ■).

6. Einfluß unterschiedlicher Konzentration von Normalserum in der Kultur auf den SIF-Nachweis

Um zu klären, ob ein Mangel an Wachstumsfaktoren oder Nährstoffen die erniedrigte Lymphozytenproliferation in den Kulturen mit SIF-positivem Serum verursacht, wurde der Einfluß steigender Konzentrationen von Normalserum auf die Hemmung untersucht.

Durch Zugabe von 5 - 10 % Normalserum kam es beim Test mit 3 Seren der Aktivität SIF-III sowie einem nicht hemmenden Serum (SIF-0) zu keiner wesentlichen Änderung der Hemmung (Indizes: 0.1 $\pm$ 0.05 bzw. 0.21 $\pm$ 0.12; Abb. 14).

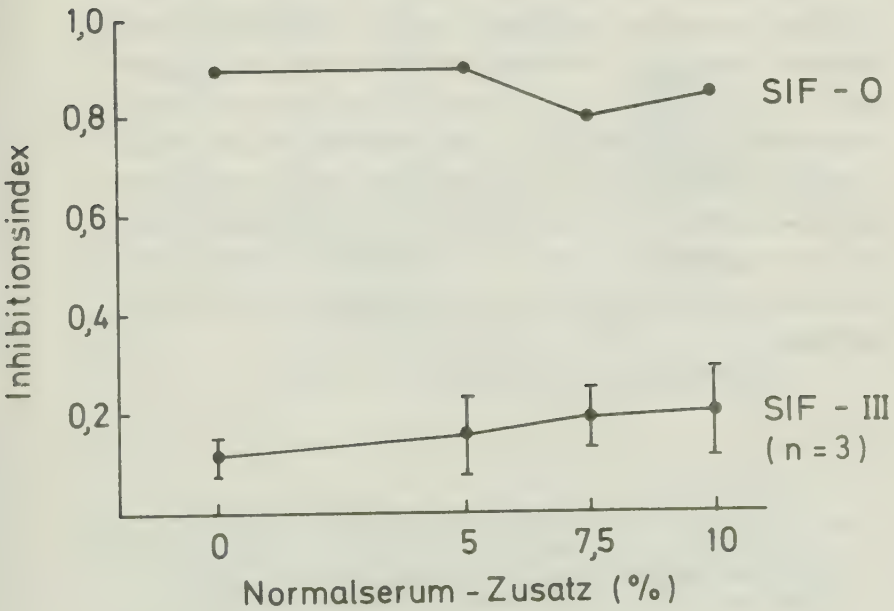


Abb. 14 Vergleich der Hemmung durch SIF-positive Seren in Abhängigkeit zur Konzentration von Normalserum (NS) im Kulturmedium. Inhibitionsindizes ($\bar{x} \pm SD$) für ein SIF-negatives Serum (SIF-0) und 3 Seren der Aktivität SIF-III nach Stimulation von Kontrollymphozyten mit 10 µg PHA/ml für 72 Stunden (Mikrotitrierplattenkultur; B III 1.1.2).

Abbildung 15 zeigt an repräsentativen Beispielen den ^{3}H-Thymidineinbau in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Normalserum bzw. SIF-positiven Seren. Die Stimulierbarkeit der Lymphozyten bei 30 % Normalserum war besser als bei 10 % Normalserum. Bei Zusatz von 20 % SIF-positiven Seren zu Kulturen, die 10 % Normalserum enthielten, erniedrigte sich die Thymidinaufnahme deutlich. Diese Versuche schließen einen Nährstoffmangel aus und sprechen für eine aktive Hemmung durch das SIF-positive Serum.

7. Einflüß virologischer, biochemischer und anderer Faktoren auf den SIF-Nachweis bei Patienten mit Hepatitis

Da SIF-Bestimmungen im Verlauf akuter und chronischer Hepatitiserkrankungen durchgeführt werden sollten, mußte geklärt werden, ob die bei dieser Krankheit auftretenden Serumprodukte und Antikörper oder die Einnahme immunsuppressiver Medikamente einen Einfluß auf den SIF-Nachweis haben (Tabelle 7). Zwischen der SIF-Aktivität und dem Nachweis von Virus-assoziierten Antigenen (HB_sAg, e-Antigen), Autoantikörpern und anderen Antikörpern sowie Immunkomplexen bestand keine signifikante Korrelation. Weiterhin war keine Beziehung zwischen SIF und der Konzentration von Bilirubin, Transaminasen, α_2-Makroglobulin und α-Fetoprotein feststellbar. Gleiches gilt für die Einnahme immunsuppressiver Medikamente.

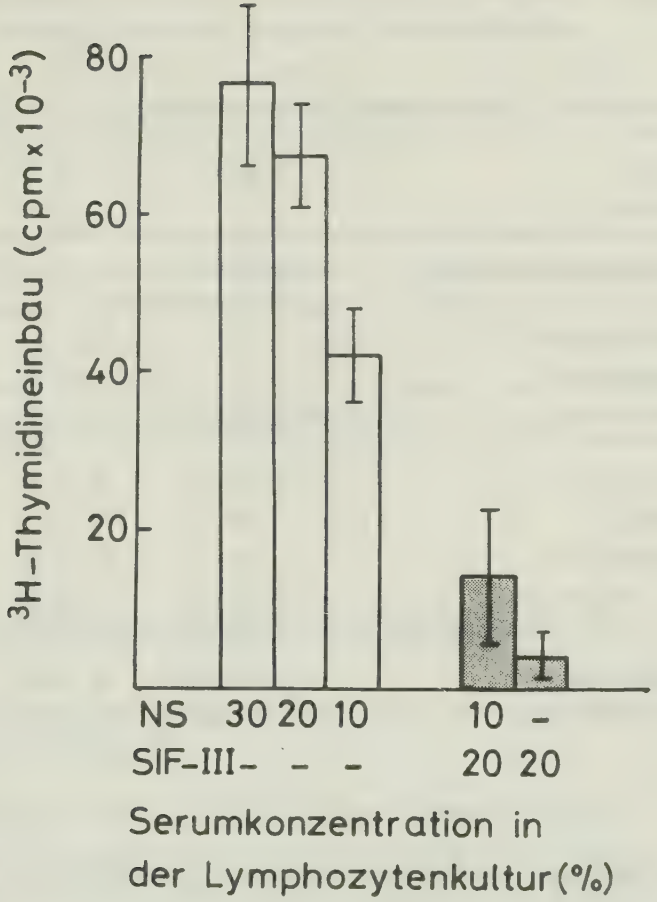


Abb. 15 ^{3}H-Thymidineinbau ($\bar{x}$ + SD) normaler Lymphozyten nach Stimulation mit 10 µg PHA/ml für 72 Stunden (Mikrotitrierplattenkultur; B III 1.1.2) unter Zusatz von 30 - 10 % homologen Normalseren (n = 2) oder von 20 % SIF-positiven Seren (n = 4) mit oder ohne 10 % NS-Zusatz.

Tabelle 7 Korrelation der SIF-Aktivität mit virologischen, biochemischen und anderen Faktoren bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis

Korrelation der SIF-Aktivität mit	Konzentrationsbereich	n	r	Signifikanz
HB_sAg	>2.5 ng/ml	89	0.01	n.s.
e-Antigen	-	25	0.03	n.s.
Autoantikörper (SMA/ANA)	1/10 - 1/40 (Serumverdünnung)	80	0.20	f.s.
Lymphozytotoxine	-	15	-	n.s.
Immunkomplexe	-	14	0.02	n.s.
Immunglobuline	20 - 65 rel.%	57	0.10	n.s.
Transaminasen	50 - 1700 IE/l	95	0.19	n.s.
Bilirubin	20 - 650 µ M/l	75	0.02	n.s.
Alpha-Fetoprotein	5 - 100 ng/ml	41	0.25	n.s.
α_2-Makroglobulin	1,5 - 3,0 g/l	15	0.42	n.s.
Corticosteroidtherapie	5 - 75 mg/Tag	88	0.20	n.s.
Azathioprintherapie	50 - 150 mg/Tag	42	0.14	n.s.

Zusammenfassend lassen die Untersuchungen folgende Rückschlüsse zu:

1. Für den Nachweis von Serumhemmfaktoren sollten Lymphozyten mit guter Stimulierbarkeit durch PHA verwendet werden, da sie eine eindeutigere Interpretation der unterschiedlichen SIF-Aktivitäten zulassen. Eventuell kann das Testsystem durch die Verwendung heterologer Lymphozyten weiter standardisiert werden.

2. Der Effekt SIF-positiver Seren wurde mit großer Wahrscheinlichkeit nicht durch eine Veränderung des Kulturmediums hervorgerufen, wie z. B. Bindung von Mitogen an Serumproteine oder durch Nährstoffmangel. Optimale Testbedingungen für den SIF-Nachweis bestanden bei zweitägiger Lymphozytenstimulation mit 10 µg PHA/ml unter Zusatz von 10 % Normalserum.

3. In dieser Testanordnung konnten mit den Seren von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Ein Einfluß von Immunkomplexen, erhöht nachweisbaren α-, β -, γ -Globulinen und Leberenzymen konnte nicht festgestellt werden. Da jedoch im Einzelfall Interferenzen nicht auszuschließen sind, wurden für die Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung der SIF-Aktivität nur ausgewählte Standardseren verwendet.

II 1. SIF-Nachweis bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis

1.1 Nachweis von SIF im Ablauf der HB_sAg-positiven und HB_sAg-negativen akuten Virushepatitis

Bei 21 Patienten mit einer unkompliziert verlaufenden akuten Virushepatitis (17 Patienten HB_sAg-positiv, 4 Patienten HB_sAg-negativ) wurde die SIF-Aktivität der Seren im Ablauf der Infektion getestet. Im frühen Stadium der Hepatitis (1. - 2. Woche) war eine deutliche Hemmung in 33 % der getesteten Seren mit einem Index zwischen 0.5 und 0.35 und eine starke Hemmung mit einem Index zwischen 0.3 und 0.1 in 38 % der Fälle nachweisbar. Die hemmende Aktivität nahm im Laufe der Entzündung ab; sie war bei 76 % der Seren nach der 4. und bei allen Patienten nach der 7. Woche nicht mehr feststellbar (Abb. 16).

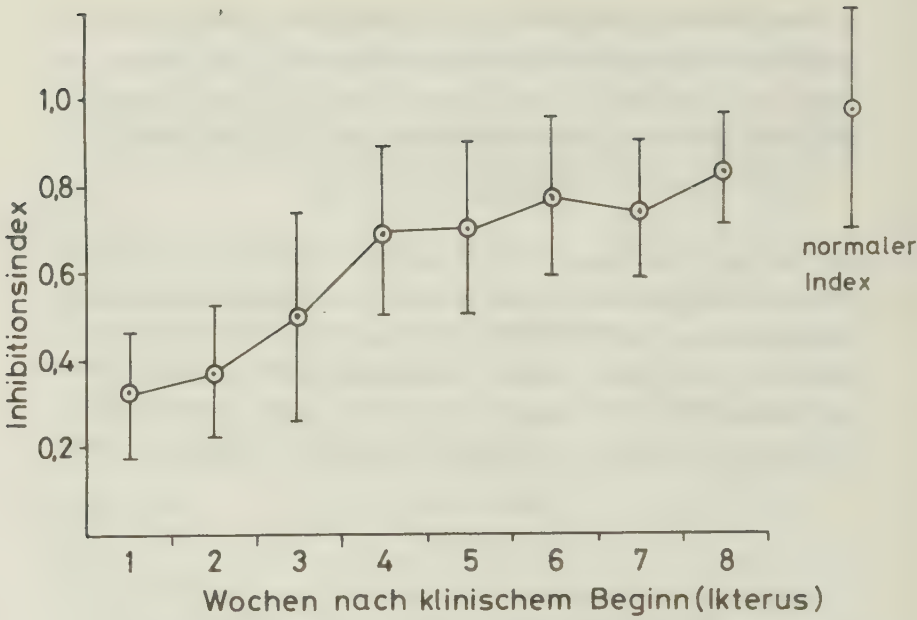


Abb. 16 SIF-Nachweis im Ablauf der akuten Virushepatitis. Inhibitionsindizes ($\bar{x} \pm SD$) der pro Woche getesteten Seren von 21 Patienten mit unkompliziert verlaufender akuter Virushepatitis (17 Patienten mit HB, 2 HA, 2 NonA-NonB). Die Mittelwerte der ersten zwei und der achten Woche unterscheiden sich signifikant ($P < 0.01$) (Normal-Index siehe B III 1.2.2).

1.2 Nachweis von SIF bei 6 Patienten mit HB_sAg-positiver Hepatitis in der Inkubationsphase

Seren von 6 Patienten mit akuter Virushepatitis konnten nachträglich bis zu 16 Wochen vor Ausbruch der Hepatitis getestet werden (Abb. 17 a). Bei zwei der Patienten (H.S. und M.K.St.) war die SIF-Aktivität 4 Wochen vor Beginn der akuten Entzündung mit einem Index von 0.35 bzw. 0.4 bereits nachweisbar.

In einem Fall (H.S.) war der Test auf SIF eine Woche vor dem Auftreten von HB_sAg positiv. Bei 4 Patienten wurde die stärkste Hemmung (Index zwischen 0.1 - 0.35) vor Beginn der akuten Hepatitis gefunden.
Die Abbildung zeigt ferner, daß keine Beziehung bestand zwischen dem Nachweis von HB_sAg bzw. anti-HB_s und der SIF-Aktivität.
Auch die während der Hepatitis auftretenden Antikörper gegen Kerne (ANA) und glatte Muskulatur (SMA) traten unabhängig von den Seruminhibitionsfaktoren auf (Abb. 17 b). Dagegen korrelierten SIF-Aktivität und anti-LSP-Antikörper im Ablauf der Hepatitis, nicht jedoch während der Inkubationszeit, in der anti-LSP-Antikörper im Gegensatz zu SIF nicht nachweisbar waren (Abb. 17 c).

Abbildung 18 zeigt einen typischen Verlauf, aus dem besonders deutlich hervorgeht, daß zum Zeitpunkt höchster entzündlicher Aktivität der SIF-Nachweis bereits negativ wird.

1.3 Nachweis von SIF bei 20 Patienten mit HB_sAg-positiver chronischer Hepatitis

11 Patienten mit HB_sAg-positiver CAH und 9 Patienten mit HB_sAg-positiver Leberzirrhose wurden in einem Zeitraum von 1.5 - 4 Jahren auf Hemmfaktoren untersucht. Die Mittelwerte der Inhibitionsindizes der getesteten 92 Seren von Patienten mit CAH betrugen 0.58 ± 0.2 und die Werte der 58 Seren von Patienten mit Leberzirrhose 0.41 ± 0.25. Die großen Standardabweichungen sind darauf zurückzuführen, daß bei den Patienten sowohl stark hemmende als auch gering hemmende Seren gefunden wurden. Tabelle 8 stellt den Inhibitionsindizes dieser Patientenseren die Werte aus der frühen und späten Phase der akuten Virushepatitis gegenüber.

Auf die klinische Relevanz der Ergebnisse im Hinblick auf die prognostische Bedeutung des Nachweises von SIF wird im Kapitel IV eingegangen.

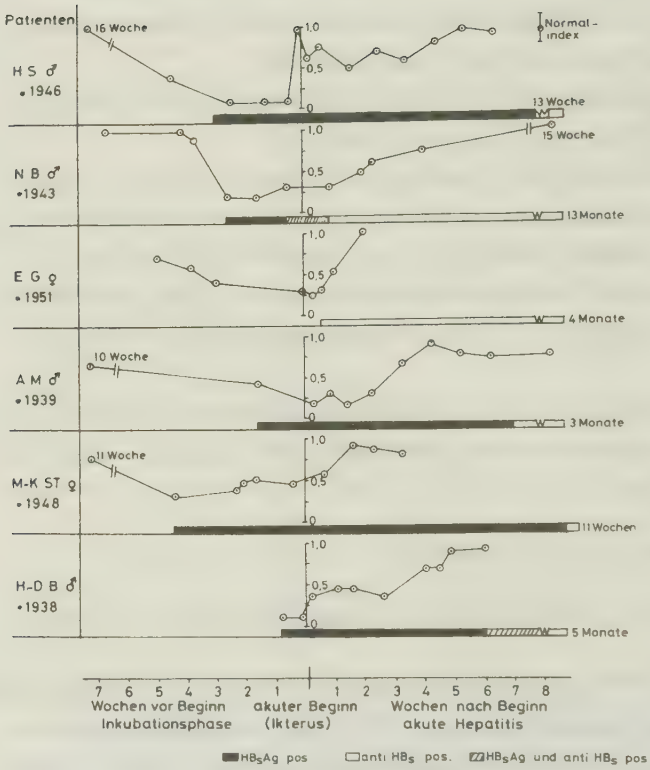


Abb. 17 a Nachweis von SIF bei 6 Patienten mit HB_sAg-positiver akuter Virushepatitis in der Inkubations- und akuten Phase in Abhängigkeit von HB_sAg und anti-HB_s.

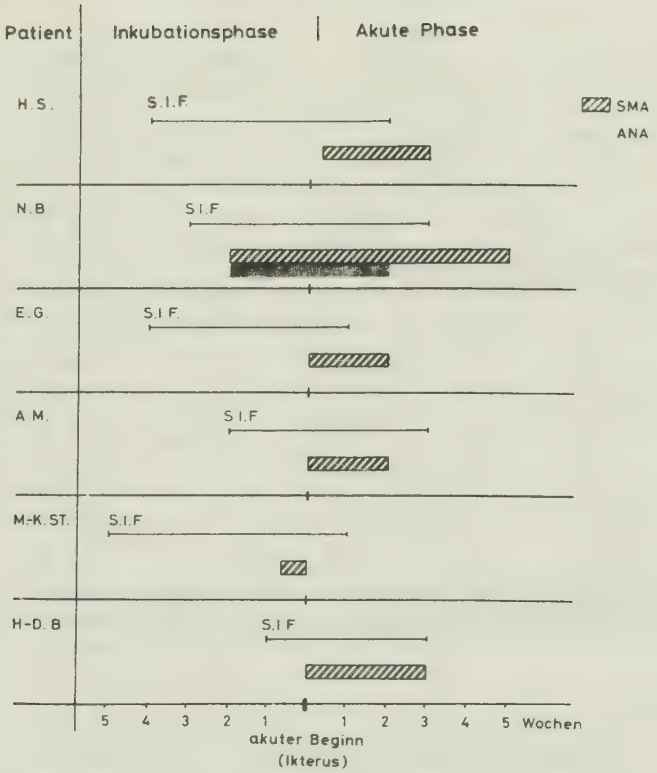


Abb. 17 b Nachweis von SIF bei 6 Patienten mit HB$_s$Ag-positiver akuter Virushepatitis in der Inkubations- und akuten Phase in Abhängigkeit vom Autoantikörpernachweis (SMA, ANA).

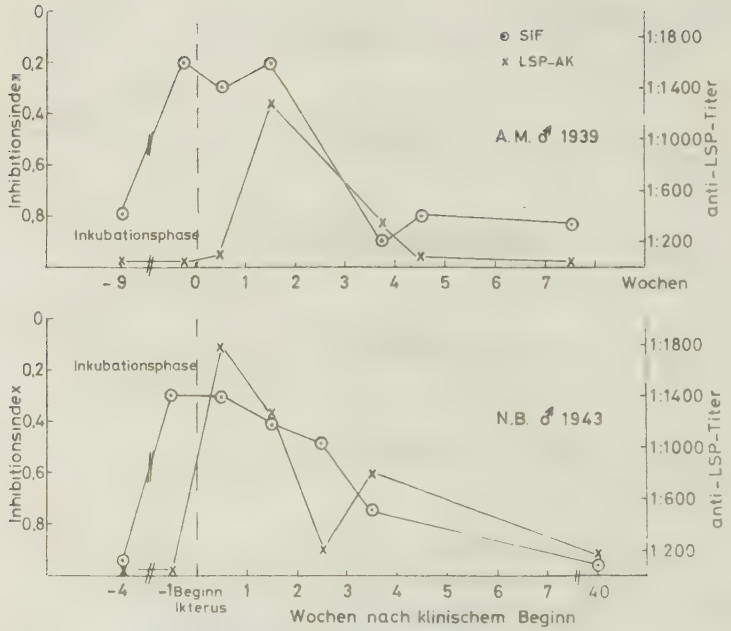


Abb. 17 c Vergleich von SIF- und anti-LSP-Aktivität bei 2 Patienten mit HB Ag-positiver akuter Virushepatitis in der Inkubationsphase und akuten Phase. Auf den Ordinaten sind Inhibitionsindex (umgekehrte Skala) und anti-LSP-Titer aufgezeichnet.

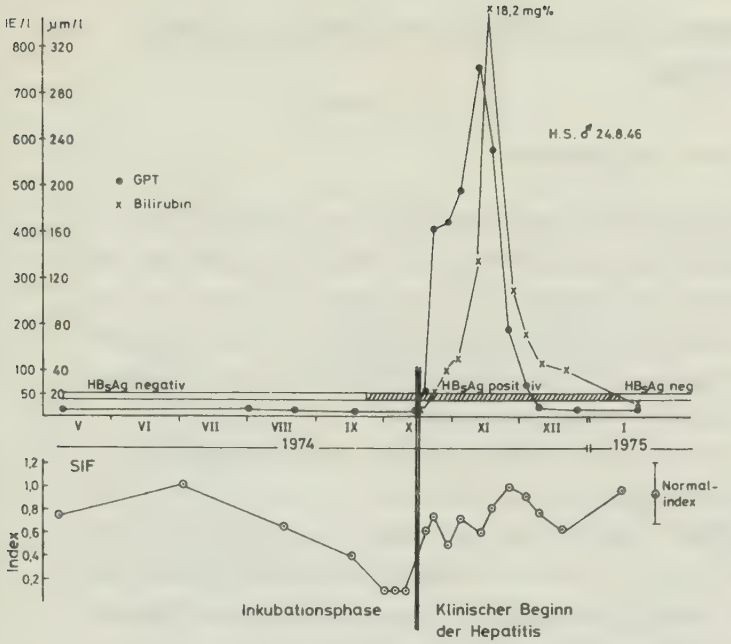


Abb. 18 Vergleich von SIF-Nachweis und entzündlicher Aktivität bei einem Patienten mit HB_sAg-positiver Hepatitis in der Inkubationsphase und akuten Phase.

Tabelle 8 SIF-Bestimmung bei 21 Patienten mit akuter Virushepatitis und 20 Patienten mit HB_sAg-positiver CAH

Diagnose		Patienten (n)	Seren (n)	Inhibitionsindex ($\bar{x} \pm SD$)
AVH	1.-2. Woche	21	45	0.36 ± 0.18
	6.-8. Woche	19	37	0.76 ± 0.1
HB_sAg^+ CAH		11	92	0.58 ± 0.2
HB_sAg^+ Leberzirrhose		9	58	0.41 ± 0.25

II 2. Mitogen-induzierte Lymphozytenstimulierbarkeit bei Patienten mit Hepatitis

2.1 Stimulation in Normalserum

Der Nachweis einer Hemmung der Mitogen-induzierten Proliferation normaler Lymphozyten durch Seren aus der Frühphase der akuten Virushepatitis warf die Frage auf, ob während der Infektion auch die Lymphozyten verändert reagieren. Aus diesem Grunde wurden bei 13 Patienten im Verlauf der akuten Virushepatitis wiederholt Lymphozytentransformationsteste in Gegenwart von 15 % Normalserum-Pool mit PHA als Mitogen durchgeführt.
Abbildung 19 zeigt einen Vergleich der Lymphozytenstimulierbarkeit mit der SIF- und Transaminasenaktivität an einem repräsentativen Beispiel. Die wöchentlich durchgeführten Stimulationsteste ergaben große Schwankungen des ^{3}H-Thymidineinbaus, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede gegenüber Normalpersonen festgestellt werden. Eine Beziehung zwischen Lymphozytenstimulation und SIF- und Transaminasenaktivität bestand nicht.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei Stimulation mit 2 µg und 50 µg PHA/ml sowie bei zwei anderen in gleicher Weise untersuchten Patienten.

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Lymphozytenstimulation mit 2, 10 und 50 µg PHA/ml der im Verlauf der akuten Virushepatitis getesteten 9 Patienten zusammengefaßt. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte zum Kontrollkollektiv waren nicht feststellbar.
Wie bei den gesunden Spendern bestand bei den wiederholt getesteten Patienten (Abb. 21) eine unterschiedliche Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch PHA.

Im Unterschied zu Patienten mit akuter Virushepatitis fielen bei 6 wiederholt getesteten Patienten mit CAH erhöhte Mittelwerte des ^{3}H-Thymidineinbaus bei Stimulation mit 2 µg und 10 µg PHA/ml auf (Abb. 22).

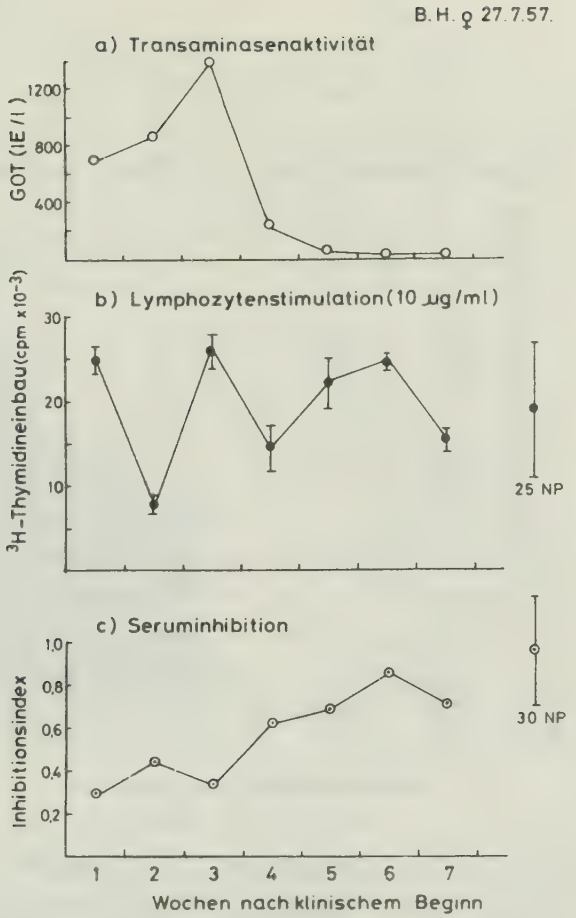


Abb. 19 Vergleich von Lymphozytenstimulation (10 µg PHA/ml) (b) mit Seruminhibition (c) und Transaminasenaktivität (a) bei einer Patientin mit HB_sAg-positiver Virushepatitis im Ablauf der akuten Phase. ^{3}H-Thymidineinbau ($\bar{x} \pm SD$) nach 3 Tagen Röhrchenkultur (siehe B III 1.1.3) der Lymphozyten in Gegenwart von 15 % NS-Pool.

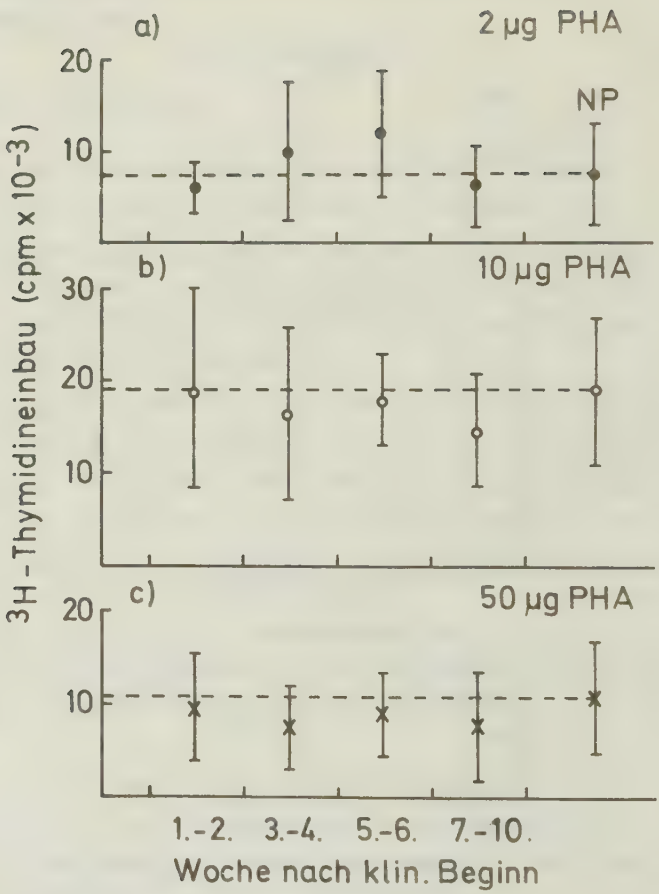


Abb. 20 PHA-induzierte Lymphozytenstimulation bei 9 Patienten im Ablauf einer unkompliziert verlaufenden Virushepatitis (7 Hepatitis B, 1 Hepatitis A, 1 NonA-NonB Hepatitis). Mittelwerte ($\bar{x} \pm SD$) der ^{3}H-Thymidinaufnahme nach 3 Tagen Röhrchenkultur (siehe B III 1.1.3) in Gegenwart von 2 µg PHA (a), 10 µg PHA (b) bzw. 50 µg PHA/ml (c) und 15 % NS-Pool. Mittelwerte von 25 Normalpersonen (NP) sind als gestrichelte Linie angegeben.

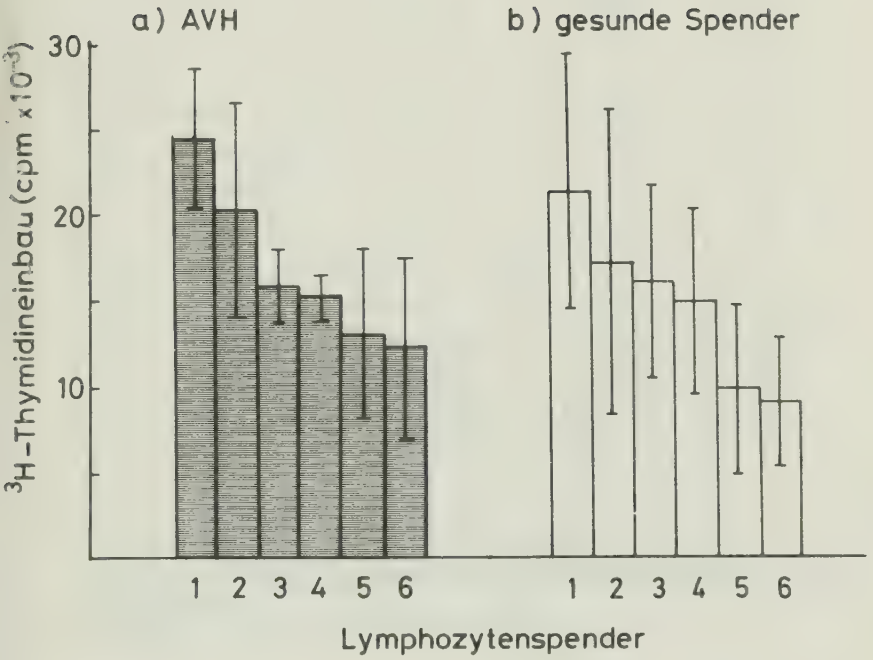


Abb. 21 Vergleich der Lymphozytenstimulierbarkeit durch 10 µg PHA/ml bei 6 Patienten mit akuter Virushepatitis (a) und 6 gesunden Spendern (b). ^{3}H-Thymidineinbau ($\bar{x} \pm SD$) von 4 - 7 Lymphozytentransformationstesten.

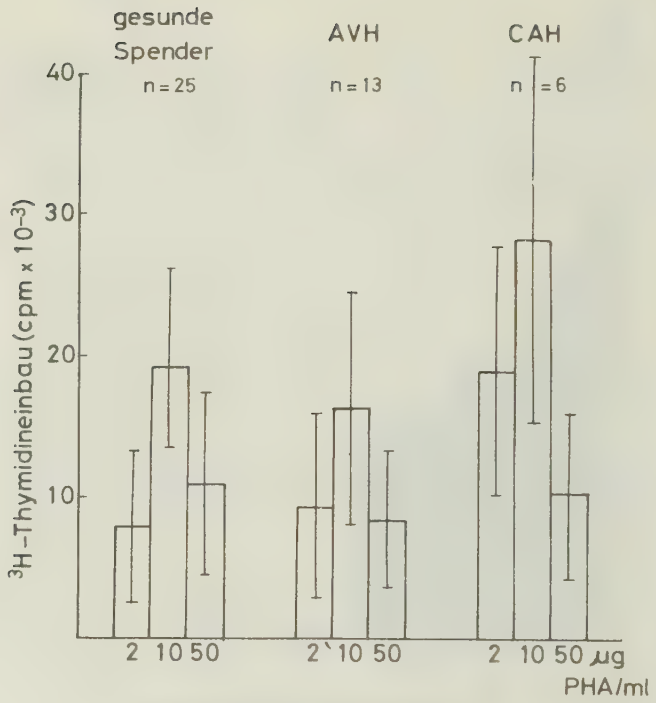


Abb. 22 PHA-induzierte Lymphozytenstimulation bei 25 gesunden Spendern, 13 Patienten mit akuter Virushepatitis und 6 Patienten mit CAH. Mittelwerte ($\bar{x} \pm SD$) des ^{3}H-Thymidineinbaus 3 Tage nach Stimulation mit 2, 10 und 50 µg PHA/ml (Röhrchenkultur; siehe B III 1.1.3). Für 2 µg und 10 µg PHA/ml unterscheiden sich die Mittelwerte von Normalpersonen und CAH ($P < 0.01$) sowie akuter Virushepatitis und CAH ($P < 0.05$) signifikant.

2.2 Stimulation im autologen Plasma

Es war von Interesse festzustellen, in wieweit die Lymphozyten der Patienten durch autologes Serum (Plasma) in ihrer Reaktivität gegenüber Mitogenen zu beeinflussen waren. Dazu wurden gewaschene Patientenlymphozyten in 6 Fällen in Gegenwart von autologem SIF-positiven und in 4 Fällen von SIF-negativen Serum stimuliert und ferner bei 5 Patienten das Verhalten der Lymphozyten in der Vollblutkultur untersucht. Eine Hemmung der Patientenlymphozyten durch autologes SIF-positives Plasma war sowohl mit gewaschenen Lymphozyten als auch mit Lymphozyten in der Vollblutkultur feststellbar, während die Lymphozyten im SIF-negativen Plasma gut stimulierbar waren. Bei diesen Versuchen wurde mit verschiedenen Konzentrationen von PHA und PWM gearbeitet.
Abbildung 23 zeigt das Ergebnis eines Versuches, bei dem Lymphozyten einer Patientin mit akuter Virushepatitis (schwarze Säulen) und eines gesunden Spenders (weiße Säulen) unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen mit 10 µg PHA/ml stimuliert wurden. Aus der Abbildung ist auch ersichtlich, daß das SIF-positive Serum die Lymphozytenproliferation in der Vollblutkultur gleich stark hemmen kann, wie die Proliferation von isolierten und gewaschenen Lymphozyten (Inhibitionsindizes 0.17 - 0.25). Die einzelnen Versuche wurden mit Lymphozyten- und Serumspendern der gleichen Blutgruppe durchgeführt, um dadurch Agglutinationsreaktionen auszuschließen.

II 3. Einfluß von SIF-positivem Serum auf die erhöhte spontane Proliferation von Patientenlymphozyten

In Vorversuchen konnte bei Patienten in den ersten zwei Wochen nach Beginn der akuten Virushepatitis eine erhöhte spontane Proliferation der Lymphozyten nachgewiesen werden mit einem mittleren Index von 4.1 ± 1.3 im Vergleich zum ^{3}H-Thymidineinbau von Kontrollymphozyten. Es war daher von Interesse zu untersuchen, ob der erhöhte spontane Einbau radioaktiven Thymidins durch SIF-positives Serum gehemmt wird.

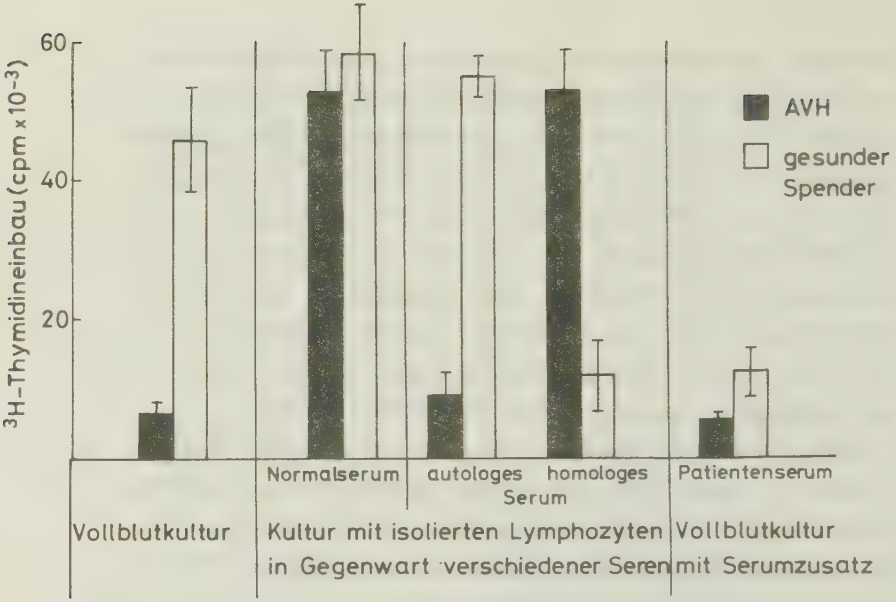


Abb. 23 Vergleich der Stimulierbarkeit von Lymphozyten in Vollblutkulturen (siehe B III 1.3.1) mit 4-mal gewaschenen Lymphozyten bei einer Patientin mit akuter Virushepatitis B (schwarze Säulen) und einem gesunden Spender (weiße Säulen). Zusatz von Normalserum, Patienten- und Spenderserum. ^{3}H-Thymidineinbau ($\bar{x} \pm SD$) nach 3 Tagen Stimulation mit 10 µg PHA/ml.

Aus Abbildung 24 ist ersichtlich, daß das stark hemmende Patientenserum die erhöhte Thymidinaufnahme nicht nur an isolierten Lymphozyten, sondern auch in der Vollblutkultur beeinträchtigen konnte. Der Nachweis der erhöhten spontanen Lymphozytenproliferation war in der Vollblutkultur nur mit Lymphozyten des SIF-negativen Patienten (gestreifte Säulen) möglich; bei der SIF-positiven Patientin (schwarze Säulen) dagegen zeigten erst die gewaschenen Lymphozyten in Gegenwart von Normalserum eine erhöhte ^{3}H-Thymidinaufnahme.

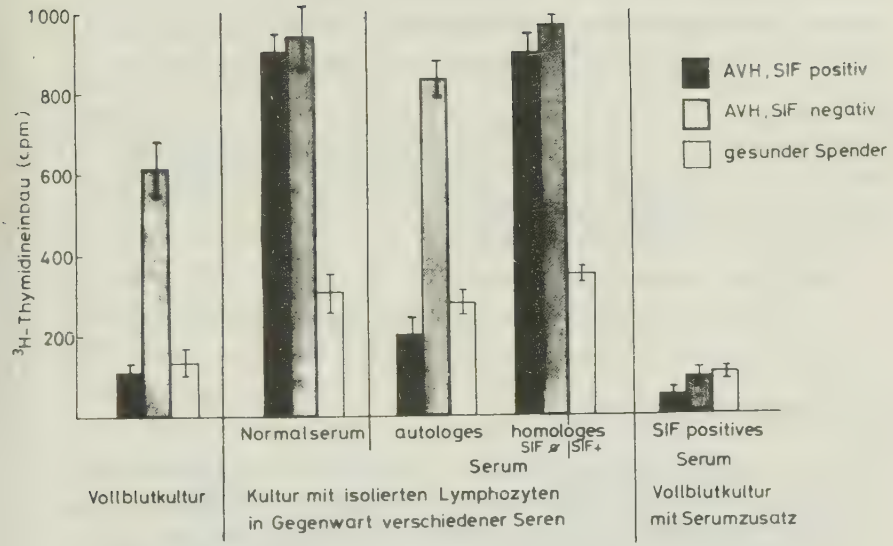


Abb. 24 Vergleich der spontanen Lymphozytenproliferation bei einem SIF-positiven Patienten (schwarze Säulen) und einer SIF-negativen Patientin (gestreifte Säulen) in der ersten Woche der akuten Virushepatitis; ferner bei einem gesunden Spender (weiße Säulen).
^{3}H-Thymidineinbau ($\bar{x} \pm SD$) in Vollblutkulturen und 4-mal gewaschener Lymphozyten nach 8 Stunden Inkubation (siehe B III 1.3.2). Zusatz von Normalserum, autologem bzw. homologem Serum.

Der ^{3}H-Thymidineinbau der isolierten Kontrollymphozyten (weiße Säulen) lag zwischen 280 und 300 cpm und in der Vollblutkultur deutlich niedriger bei 140 cpm. Das SIF-positive Serum hatte keinen Einfluß auf die Thymidinaufnahme.

Diese Untersuchungen zeigen, daß der Nachweis von Serumhemmfaktoren auch in Vollblutkulturen möglich ist. Sie sprechen dafür, daß Lymphozyten von SIF-positiven Spendern in Gegenwart des autologen Plasmas gehemmt bleiben, während die Lymphozytentransformation bei SIF-negativen Patienten durch die Vielzahl der bei der akuten Hepatitis auftretenden Serumprodukte nicht beeinflußt ist.
Ferner scheinen die in SIF-positivem Plasma zirkulierenden Lymphozyten nicht oder nur schwach stimulierbar zu sein. Dieser Effekt ist aber reversibel und die Lymphozytenfunktion selbst nicht beeinträchtigt.

III EIGENSCHAFTEN VON SIF

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen kann angenommen werden, daß die Hemmung der Lymphozytenproliferation durch Serumfaktoren hervorgerufen wird, die bereits in der Frühphase der Virushepatitis auftreten,und die auch bei chronischen Erkrankungen nachweisbar sein können. Es schien daher wichtig, die biologische Aktivität der Serumfaktoren weiter zu untersuchen und zu prüfen, inwieweit Übereinstimmungen zu den zahlreich beschriebenen immunsuppressiven Serumfaktoren bestehen und ob diese bereits definierten Faktoren zugeordnet werden können.

Die Untersuchungen erfolgten mit Seren definierter SIF-Aktivität und nicht mit isolierten Fraktionen, da Vorversuche gezeigt hatten, daß eine Anreicherung und Isolierung sehr aufwendig und schwierig ist.
Insgesamt wurden 22 Standardseren verwendet (siehe Tabelle 5, S. 23): 4 Seren waren SIF-negativ (Inhibitionsindex > 0.7), 3 Seren wiesen die SIF-Aktivität I auf mit einem Index zwischen 0.6 - 0.65, 5 Standardseren hemmten die Lymphozytenstimulation mit einem Index von 0.3 - 0.45 (SIF-II). Eine starke Hemmung mit der SIF-Aktivität III (Index 0.1 - 0.25) wurde in 9 Seren gefunden und ein Standardserum hatte eine Aktivität IV (Index < 0.1).

1. Einfluß SIF-positiver Seren auf die Lymphozytenproliferation

1.1 Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation

Zunächst sollte geprüft werden, ob die Hemmung durch SIF-positive Seren bei Stimulation mit T- wie auch mit B-Zell-Mitogenen nachweisbar ist. Neben Phytohämagglutinin (PHA) wurden Concanavalin A (ConA) und Limabohnenlektin (Lima) als T-Lymphozyten-Mitogene (Greaves et al., 1974; Bessler et al., 1976) und Pokeweed-Mitogen (PWM) als T- und B-Zellen stimulierendes Mitogen (Geha und Merla, 1974; Mellstedt, 1975) verwandt. Für die Stimulation von B-Zellen wurde Staphylokokken-Protein A (SPA) bei Humanlymphozyten (Forsgren et al., 1976; Möller und Landwall, 1977) sowie LPS bei Mäuselymphozyten (Janossy et al., 1973) eingesetzt.

Repräsentative Ergebnisse stellen die in Abb. 25 eingezeichneten Inhibitionsindizes für jeweils ein Standardserum unterschiedlicher SIF-Aktivität nach Stimulation normaler Lymphozyten mit 3 - 8 Konzentrationen der Mitogene dar. Die Abbildung zeigt, daß die Seren je nach SIF-Aktivität unabhängig von dem jeweils verwandten Mitogen relativ einheitlich hemmten, wobei die Inhibition der ConA induzierten Lymphozytentransformation schwächer ausgeprägt war als bei PWM, Lima und SPA.
Insgesamt lagen bei der Untersuchungsreihe mit 14 Standardseren 68 % aller Indexwerte in den mit dem SIF-Standardtest definierten Aktivitätsbereichen. In 52 % der ermittelten Dosiswirkungskurven fand sich die stärkste Hemmung bei den niedrigsten Mitogenkonzentrationen. Bei optimalen Mitogendosen (siehe Abb. 3 und 4, S. 25) war die Inhibition in den meisten Fällen (86 %) schwächer, nahm jedoch in 95 % der Fälle in supraoptimalen Konzentrationen wieder zu, und zwar bei PHA in 37 von 43 und bei ConA in 12 von 15 Kurven. Bei Verwendung von Limalektin fand sich die geringste Inhibition bei der höchsten Mitogenkonzentration, wobei in diesem Falle jedoch die optimale Stimulationsdosis nicht überschritten wurde (siehe Abb. 4).

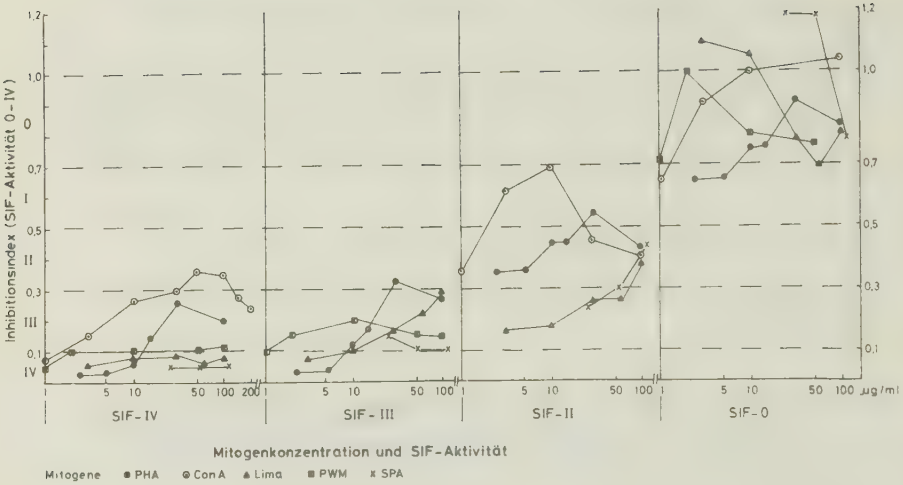


Abb. 25 Einfluß SIF-positiver Seren auf die Stimulation der Lymphozyten zweier gesunder Spender mit verschiedenen Mitogenen: PHA (2.5 - 100 µg/ml), ConA (1 - 200 µg/ml), Limabohnenlektin (3 - 100 µg/ml) nach 3 Tagen Kultur sowie mit PWM (1 - 100 µg/ml) nach 4 Tagen Kultur (Mikrotitrierplattenmethode mit 10 % NS; siehe B III 1.1.2). Mittlere Inhibitionsindizes für die SIF-positiven Standardseren unterschiedlicher Aktivität (IV-0). Dosiswirkungskurven im NS siehe Abb. 3 und 4.

Neben den Humanlymphozyten wurden in einem weiteren Versuch Mäuselymphozyten verwendet, da für dieses System T- und B-Zellabhängige Mitogene besser definiert sind, als für menschliche Lymphozyten. Die Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis, daß die Proliferation von T- und B-Lymphozyten beeinträchtigt wird.

In Abbildung 26 ist der ^{3}H-Thymidineinbau der Mäuselymphozyten nach Stimulation mit optimalen Konzentrationen von ConA und LPS in Abhängigkeit vom Serumzusatz angegeben. Mit 50 µg ConA stimulierte Lymphozyten wurden durch SIF-Standardseren der Aktivität IV stark (Inhibitionsindex 0.25), der SIF-Aktivititat III und II deutlich gehemmt (Index 0.4 bzw. 0.5). Die Hemmung war bei Verwendung von 2 und 10 µg ConA/ml stärker ausgeprägt.

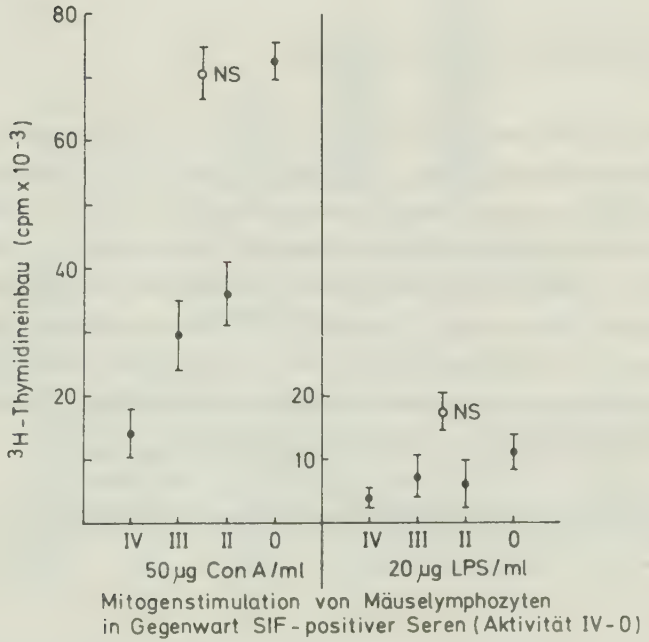


Abb. 26 Einfluß SIF^{+} Seren auf die Stimulation von Mäuselymphozyten mit ConA und LPS. ^{3}H-Thymidineinbau ($\bar{x} \pm SD$) bei Kultur mit 20 % NS-Pool bzw. Standardseren unterschiedlicher SIF-Aktivität. Kulturbedingungen siehe unter B III 1.3.8.

Auch die Stimulation der Mäusemilzzellen mit 20 µg LPS wurde durch die SIF-positiven Seren gehemmt. Allerdings nahm die Hemmung nicht parallel zu der definierten SIF-Aktivität ab. Die Inhibitionsindizes betrugen für das Serum mit Aktivität SIF-IV 0.2, für SIF-III 0.35, für SIF-II 0.3 und für SIF-0 0.65. Auch bei Kultur mit 4 bzw. 100 µg LPS/ml hemmten die SIF-positiven Seren, wobei für die stark hemmenden Seren bei 100 µg nur ein Index um 0.5 ermittelt wurde.

1.2 PPD-induzierte Lymphozytenproliferation

Die bisherigen Ergebnisse über den Einfluß von SIF auf die unspezifisch induzierte Lymphozytenproliferation führten zu der Frage, inwieweit auch die Antigen-spezifische Stimulation sensibilisierter Lymphozyten beeinflußt wird. Als Testsystem wurde die Stimulation der Lymphozyten Tuberkulin-positiver Spender mit PPD-Tuberkulin verwandt. Der Einfluß SIF-positiver Standardseren auf die Stimulation mit 50 µg PPD/ml ist in Abb. 27 dargestellt. Alle 7 Seren der Aktivität SIF-III verursachten eine starke Hemmung (Index = 0.2 ± 0.08), während ein SIF-negatives Serum kaum einen Effekt zeigte (Index = 0.7). Bei Zusatz der 4 Seren mit der SIF-Aktivität II lag der mittlere Index bei 0.35 ± 0.1.

Wurden statt 50 µg Antigen 10 µg PPD/ml verwendet, war die Inhibition im gleichen Verhältnis stärker nachweisbar.

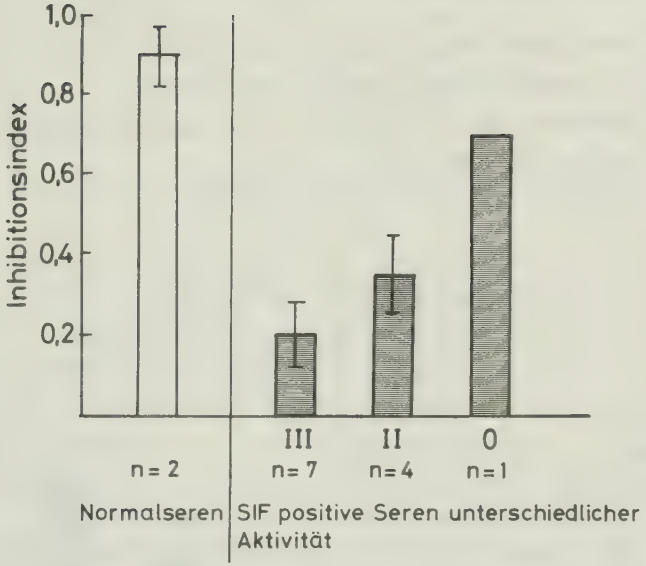


Abb. 27 Einfluß SIF^+ Seren auf die PPD-induzierte Lymphozytenproliferation. Inhibitionsindizes ($\bar{x} \pm SD$) für 2 NS bzw. 12 SIF-Standardseren unterschiedlicher Aktivität nach 5-tägiger Stimulation von 1×10^6 Lymphozyten eines Tuberkulin-positiven Spenders mit 50 µg PPD/ml (Röhrchenkultur mit 10 % NS). ^3H-Thymidineinbau in Gegenwart von NS: 33 105 ± 1 340 cpm (Dosiswirkungskurve siehe Abb. 5, S. 28).

1.3 Alloantigen-induzierte Lymphozytenproliferation

Nach diesen Ergebnissen konnte angenommen werden, daß SIF-positive Seren auch die Alloantigen-induzierte Lymphozytenstimulation beeinflussen können.

In zwei Versuchen wurden deshalb Lymphozyten von je drei nicht verwandten gesunden Spendern in einer Zweiweg-gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) unter Zusatz von verschiedenen SIF-positiven Standardseren kultiviert.

Wie in den vorhergehenden Untersuchungen ließ sich mit den Seren der SIF-Aktivität IV und III die stärkste Inhibition erzielen, mit einem Index von 0.1 in beiden Fällen, während die Seren der Aktivität II, I und 0 abgestuft schwächere Effekte hervorriefen (Abb. 28).

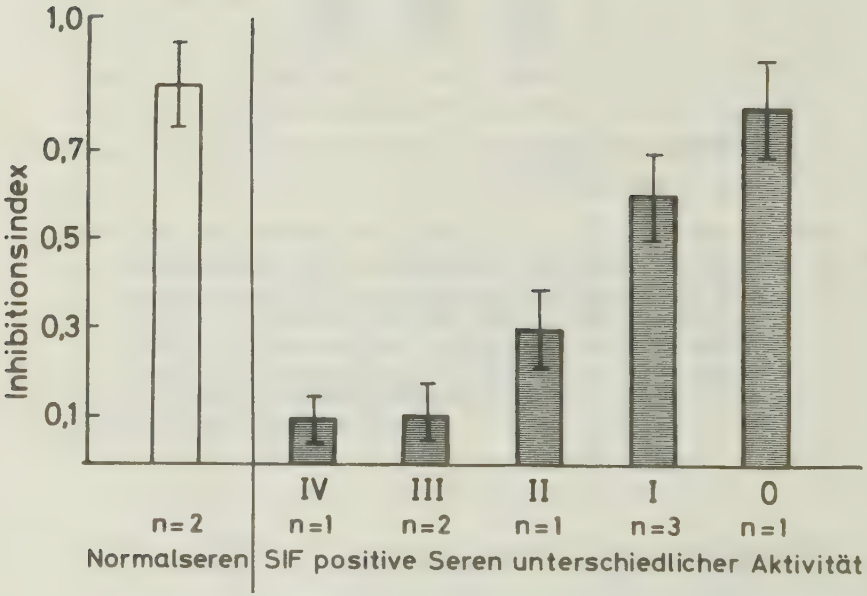


Abb. 28 Einfluß SIF$^+$ Seren auf die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR). Inhibitionsindizes ($\bar{x} \pm SD$) für 2 NS bzw. 8 Standardseren unterschiedlicher SIF-Aktivität (IV-0) nach 5 Tagen Kultur von jeweils 1×10^5 Lymphozyten von 3 nicht verwandten gesunden Spendern in einer Zweiweg-MLR. Mittlerer ^{3}H-Thymidineinbau der 3 Lymphozytenkombinationen in der Kontrolle (NS-Pool) lag bei 21 680 $\pm$ 4 850 cpm.

Die Seren wurden ferner bei einer Verdünnung von 1 : 3 in diesem Testsystem untersucht, wobei sich die Hemmung in allen Fällen verringerte (Indizes von 0.35 ± 0.06 für SIF-IV Seren, 0.4 ± 0.15 für SIF-III, 0.75 ± 0.12 für SIF-I und 0.8 ± 0.07 für SIF-0).

2. Einfluß SIF-positiver Seren auf die Leukozytenmigrationshemmung

Bisher konnte gezeigt werden, daß SIF-positive Seren die unspezifisch (Mitogen) und die spezifisch (Antigen) induzierte Lymphozytenproliferation hemmen. Es stellte sich die Frage, ob auch andere in vitro Lymphozytenfunktionen, wie z.B. die Lymphokinproduktion, beeinträchtigt werden.
Aus diesem Grunde wurde die Wirkung der Standardseren auf die PPD-induzierte Leukozytenmigrationshemmung bei einem Tuberkulin-positiven sowie -negativen Spender mit dem direkten Agarosetest nach Clausen (1971) untersucht.

Während 3 Standardseren ohne hemmende Aktivität (SIF-0) und ein Serum der Aktivität SIF-I keinen Einfluß auf die Reaktion zeigten (Migrationsindex 0.6 gegenüber der Kontrolle mit NS 0.65), war die Migrationshemmung bei Zusatz von Seren der SIF-Aktivität II, III und IV (n = 7) deutlich eingeschränkt (Abb. 29; Migrationsindizes: 0.75 - 0.92).
Ermittelt man einen Inhibitionsindex in Anlehnung an den SIF-Index, so betragen die Werte für die Seren SIF-IV, III und II: 0.42, 0.42 ± 0.2 und 0.55 ± 0.15, dagegen für die Seren SIF-I und 0: 1.15 ± 0.25.

In Abbildung 30 zeigen Bild 1 + 2 Beispiele der Migrationshemmung in Gegenwart von Normalserum (1) und einem SIF-negativen Serum (2). Bild 3 + 4 stellen die Aufhebung der Migrationshemmung durch 2 SIF-positive Seren dar.

Zusätzlich wurde untersucht, ob diese Seren die Leukozytenwanderung direkt beeinflussen, wobei die mit Normalserum und SIF-positiven Seren ermittelten Migrationshöfe verglichen wurden. In diesem Fall wurde kein PPD zugesetzt. Unter den 11 getesteten Seren hemmte ein Serum die Wanderung der Leukozyten.

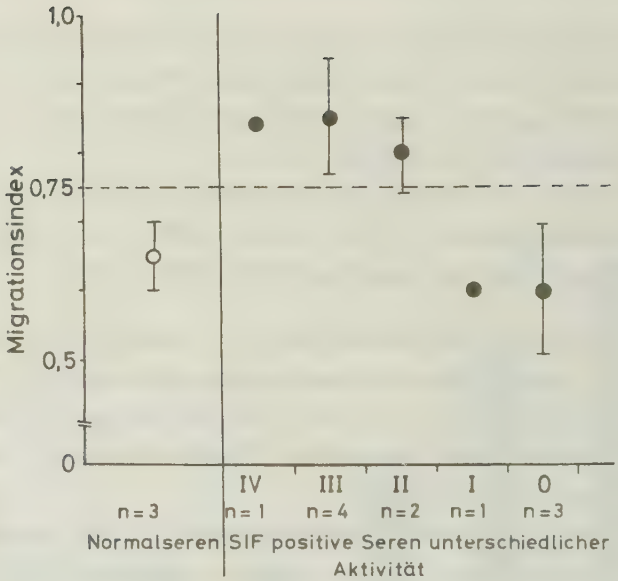


Abb. 29 Einfluß SIF$^+$ Seren auf die PPD-induzierte Leukozytenmigrationshemmung. Migrationsindizes ($\bar{x}$ + SD) bei Zusatz von 3 NS bzw. 11 Standardseren unterschiedlicher SIF-Aktivität (IV - 0) im direkten Migrationshemmtest unter Agarose (siehe B III 1.3.6) mit 1×10^6 Granulozyten eines Tuberkulin-positiven Spenders

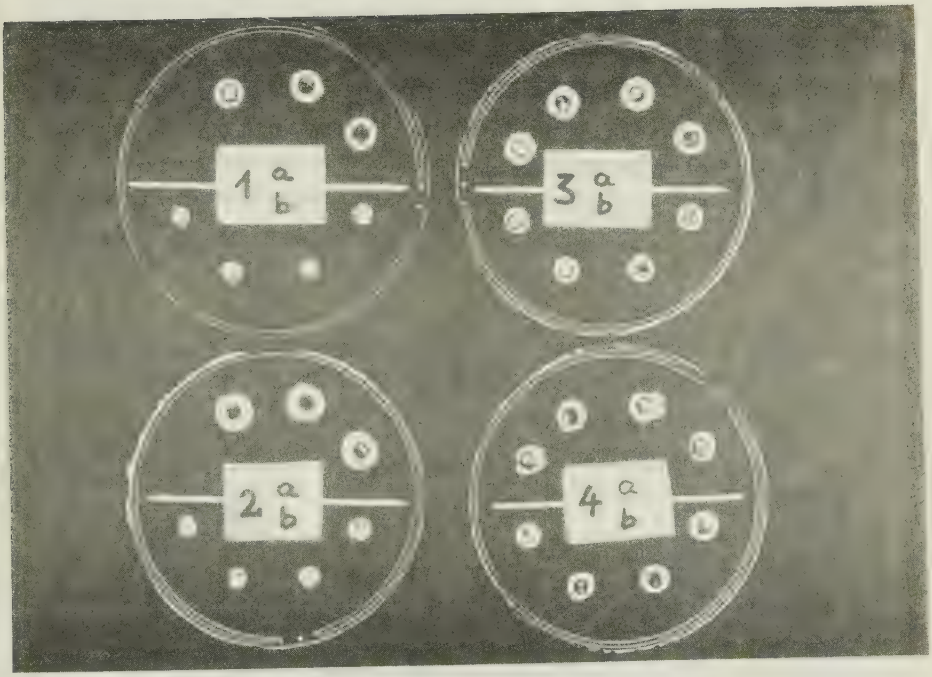


Abb. 30* PPD-induzierte Leukozytenmigrationshemmung in Gegenwart eines Normalserums (1), eines SIF-negativen Standardserums (2), sowie je eines Serums der SIF-Aktivität III (3) bzw. SIF-IV (4). Die Ansätze enthielten jeweils Medium (a) oder 100 µg PPD/ml (b). Für 1 a und 2 a wurden nur 3 Parallelansätze durchgeführt.

3. Einfluß SIF-positiver Seren auf die E-Rosettenbildung

Um SIF mit dem von Chisari und Edgington (1975) beschriebenen Rosetteninhibitionsfaktor (RIF) vergleichen zu können, wurde die E-Rosettenbildung von Lymphozyten untersucht, die 20 Stunden mit SIF-Standardseren unterschiedlicher Aktivität

* Ich danke Frau L.Brattig für das Anfertigen der Photos.

vorinkubiert wurden. Wie Abb. 31 zeigt, führte die Inkubation der Lymphozyten mit 7 SIF-positiven Seren der Aktivität SIF-IV und SIF-III zu einer Erniedrigung der Rosettenzahl (mittlere Inhibitionsindizes 0.6 ± 0.03 bzw. 0.71 ± 0.07), während 11 Seren der Aktivität II, I und 0 keine deutliche Hemmung auslösten. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen SIF-Aktivität und dem Ausmaß der Hemmung ($r = 0.72$, $n = 18$, $P < 0.05$).

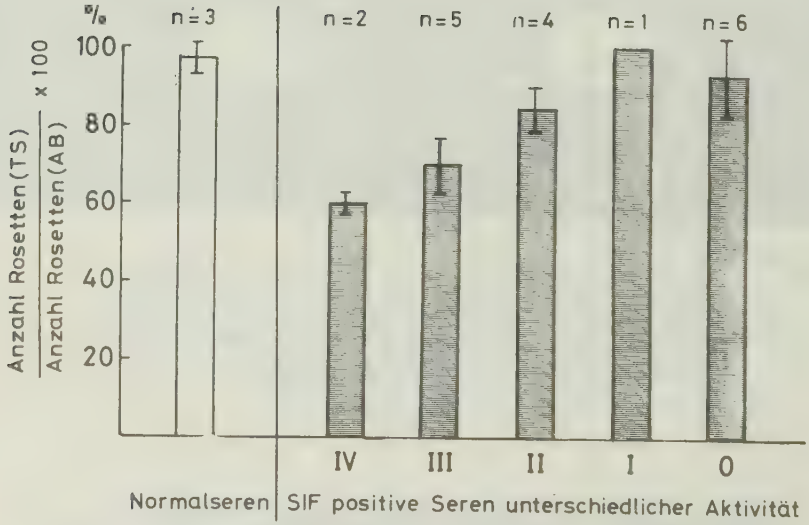


Abb. 31 Einfluß SIF^+ Seren auf die E-Rosettenbildung. Prozent ($\bar{x}$ + SD) Rosetten im Vergleich zur Kontrolle (Test mit NS (AB) = 65 ± 6 % ≙ 100 %). Vorinkubation von jeweils 2×10^5 Lymphozyten (Doppelbestimmungen) zweier gesunder Spender mit 18 SIF^+ Seren (SIF IV - 0) bzw. 3 NS und Waschen der Lymphozyten vor dem E-Rosettentest (B III 1.3.7).

Die wesentlichen Eigenschaften SIF-positiver Seren hinsichtlich ihres Einflußes auf Lymphozytenfunktionen sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Aus der Tabelle geht hervor, daß sich die unter Standardbedingungen mit 10 µg PHA/ml ermittelten SIF-Aktivitätsgrade auch mit den anderen Mitogenen und Antigenen nachweisen ließen. Serumhemmfaktoren beeinflußten sowohl die unspezifisch als auch spezifisch induzierte Lymphozytenproliferation und, in geringerem Ausmaß, auch die Leukozytenmigrationshemmung und T-Rosettenbildung. Es war noch zu klären, ob diese Wirkung irreversibel ist.

Tabelle 9 Einfluß SIF^+ Seren auf in vitro-Lymphozytenfunktionen. Inhibitionsindizes für jeweils ein Standardserum der Aktivitätsgrade IV - 0. Für die Mitogen- und Antigenstimulation ist jeweils die Konzentration optimalen ^3H-Thymidineinbaus angegeben; für PHA 10 und 30 µg/ml

LYMPHOZYTENFUNKTION				SIF-AKTIVITÄT DER STANDARDSEREN IV	III	II	I	0
LYMPHOZYTENPROLIFERATION	Mitogen-induzierte Ly-proliferation (µg/ml)	Human	PHA	10	0.05	0.15	0.45	0.6	0.75
				30	0.25	0.35	0.55	0.7	0.9
			ConA	50	0.35	-	0.45	0.65	1.0
			Lima	100	0.07	0.3	0.45	-	0.8
			PWM	0.5	0.1	0.15	-	-	0.75
			SPA	54	0.05	0.1	0.3	0.55	1.1
		Maus	ConA	50	0.25	0.4	0.5	-	1.0
			LPS	20	0.2	0.35	0.3	-	0.65
	Antigen induziert		PPD	50	-	0.2	0.35	-	0.7
	Alloantigen induziert				0.1	0.1	0.3	0.6	0.8
mittlerer Index $\bar{x}$					0.17 ± 0.1	0.25 ± 0.12	0.4 ± 0.1	0.62 ± 0.05	0.85 ± 0.01
Leukozytenmigrationshemmung					0.42	0.57	0.57	1.15	1.2
T-Rosettenbildung					0.6	0.65	0.85	1.0	0.95

4. Kinetik und Reversibilität der SIF-Wirkung auf die PHA-induzierte Lymphozytenproliferation

Um Kenntnisse über die Wirkungsweise SIF-positiver Seren zu erlangen, wurden erstens Standardseren vor und nach Beginn der Lymphozytenstimulation der Kultur zugesetzt und zweitens diese Seren nach einer bestimmten Einwirkungszeit aus der Kultur entfernt.

4.1 Eine Vorinkubation der Lymphozyten mit SIF-positiven Seren für 3, 8 oder 18 Stunden vor Beginn der Lymphozytenaktivierung hatte keinen Effekt auf die Stärke der Hemmung (Abb. 32). Wurden andererseits die Seren erst nach Beginn der PHA-Stimulation zugesetzt, so nahm die hemmende Wirkung in Abhängigkeit zur Dauer der Lymphozytenaktivierung ab.
Mit Standardseren der Aktivität SIF-III (n = 4) zeigte sich eine deutliche Inhibition bei Zusatz in den ersten 8 Stunden der Lymphozytenkultur, nicht jedoch nach 12 oder 18 Stunden. Mit dem Serum der Aktivität SIF-IV lag der Index noch nach 18 Stunden bei 0.4, während eine Zugabe nach 60 Stunden keine Inhibition bewirkte. Ein Serum der SIF-Aktivität I hemmte nicht mehr, wenn es 3 Stunden nach Kulturbeginn zupipettiert wurde.

4.2 Um zu prüfen, wie lange ein Kontakt zwischen SIF-positivem Serum und den Spenderlymphozyten bestehen muß, damit eine Hemmung der Mitogen-induzierten Stimulation eintritt, wurden einmal Lymphozyten 3, 8, 18 Stunden mit SIF-positiven Seren inkubiert und erst nach Entfernen der Seren mit dem Mitogen stimuliert.
Im anderen Falle wurden diese Seren gleichzeitig mit dem PHA zugesetzt und in zeitlichen Abständen von 3, 8, 12 bzw. 18 Stunden nach Kulturbeginn durch NS ersetzt.

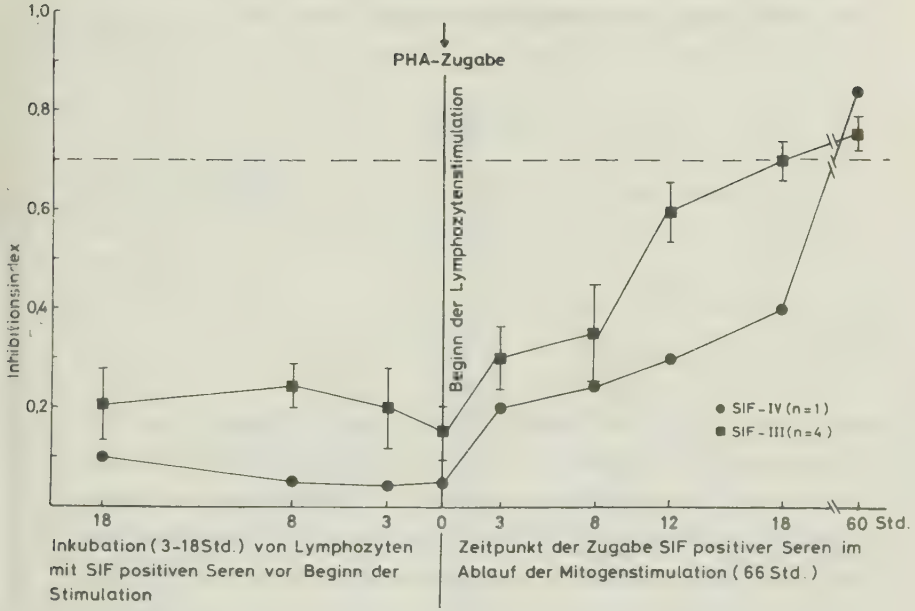


Abb. 32 Abhängigkeit der Inhibition einer PHA-Stimulation vom Zeitpunkt der Zugabe SIF^+ Seren. Inhibitionsindizes ($\bar{x} \pm SD$; Bezug NS-Pool) nach 66 Stunden Stimulation der Lymphozyten zweier Spender bei Zusatz von 2 NS bzw. SIF^+ Seren der Aktivität SIF-IV (n = 1) oder SIF-III (n = 4). Kulturbedingungen:

- 3 - 18 Stunden Vorinkubation der Lymphozyten mit den Seren und Beginn der Stimulation durch Zusatz von PHA, oder
- Zugabe der Seren 3 - 60 Stunden nach Beginn der Lymphozytenstimulation.

Inhibitionsindizes im Test ohne variierte Bedingungen auf der Ordinate bei Stunde 0.

Der ^3H-Thymidineinbau der Kulturansätze mit NS-Pool lag zwischen 70 275 ± 5 043 cpm (bei 3 Stunden Vorinkubation) und 35 130 ± 3 675 cpm (bei Zugabe nach 18 Stunden Kultur).

Bei beiden Versuchsanordnungen ergab sich, daß ein Kontakt zwischen SIF-positivem Serum und Lymphozyten von 12 - 18 Stunden notwendig war, bevor die Hemmung vollständig nachweisbar war, unabhängig, ob diese Einwirkung vor oder mit Beginn der Lymphozytenaktivierung stattfand (Abb. 33).

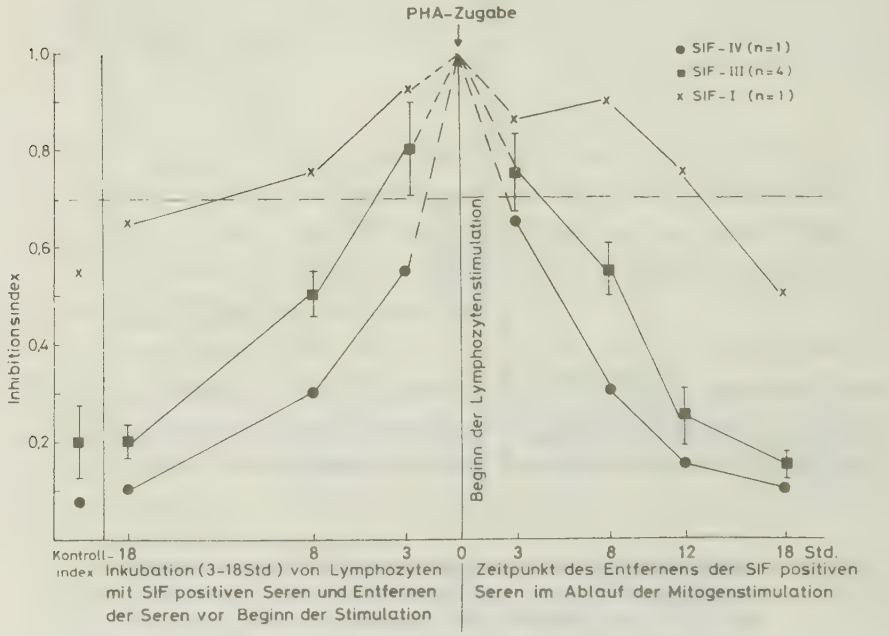


Abb. 33 Abhängigkeit der Inhibition von der Dauer der Einwirkung SIF^+ Seren auf die Lymphozyten. Inhibitionsindizes ($\bar{x} \pm SD$) nach 66 Stunden Stimulation der Lymphozyten zweier gesunder Spender mit 10 µg PHA/ml bei Zusatz von 2 NS bzw. Seren der Aktivität SIF-IV (n = 1), SIF-III (n = 3) und SIF-I (n = 1).
Kulturbedingungen:
- 3 - 18 Stunden Vorinkubation der Lymphozyten mit den Seren, Abpipettieren des Kulturmediums und Beginn der Stimulation durch Zugabe von Medium mit PHA und NS, oder
- Entfernen der SIF^+ Seren 3 - 18 Stunden nach Beginn der Lymphozytenstimulation und Zugabe von Medium mit PHA und NS.

Kontrollindex: Inhibitionsindizes der Seren ohne Mediumwechsel. Der ^3H-Thymidineinbau in den Kontrollansätzen (NS-Pool) lag zwischen 56 615 ± 3 005 cpm (bei Mediumwechsel 8 Stunden nach Stimulationsbeginn) und 17 496 ± 2 170 cpm (Wechsel nach 18 Stunden Lymphozytenstimulation)

Wurden SIF-positive Seren bereits 3 Stunden nach Beginn der PHA-Stimulation abpipettiert und durch Normalserum ersetzt, war eine Hemmung auch bei starker SIF-Aktivität nicht induzierbar. Erst nach 8 Stunden Kontakt bewirkten Seren der Aktivität SIF-IV und SIF-III eine Hemmung, die einem Index von 0.3 bzw. 0.6 $\pm$ 0.07 entsprach. Die vollständige SIF-Aktivität (Kontrollindex) wurde erst nach 18 Stunden Inkubationszeit erreicht. Seren der SIF-Aktivität I zeigten keine hemmende Wirkung, wenn sie kürzer als 18 Stunden inkubiert wurden.

Nahezu spiegelbildliche Ergebnisse fanden sich bei der zweiten Versuchsanordnung, bei der während der Einwirkungszeit von Lymphozyten und Serum kein PHA anwesend war.

4.3 Da die Testbedingungen (Mikrotitrierplattenkultur) ein Waschen der Lymphozyten nicht erlaubten, war nicht bekannt, ob die hemmende Wirkung von der Präsenz der Hemmfaktoren an der Lymphozytenoberfläche abhing. Es wurden deshalb Lymphozyten 20 Stunden lang mit dem SIF-IV Standardserum in Röhrchen vorinkubiert und nach dreimaligem Waschen mit PHA stimuliert (Abb. 34). Nach dieser Behandlung ließ sich nur noch eine leichte Hemmung feststellen (Index = 0.65). Zu einer weiteren Zunahme der Stimulierbarkeit kam es, wenn die Lymphozyten nach dem Waschvorgang 8 bzw. 20 Stunden in Normalserum inkubiert und erst anschließend stimuliert wurden (Indizes = 0.78 bzw. 0.86).

Aus den Ergebnissen muß geschlossen werden, daß die Präsenz von SIF Voraussetzung für eine Hemmung der Lymphozytenproliferation ist. Ferner ist die Hemmung reversibel. Diese Befunde stimmen damit überein, daß Patientenlymphozyten im autologen SIF-positiven Serum und in Vollblutkulturen nicht stimuliert werden konnten, nach wiederholtem Waschen jedoch normal reagierten (siehe II 2.2).

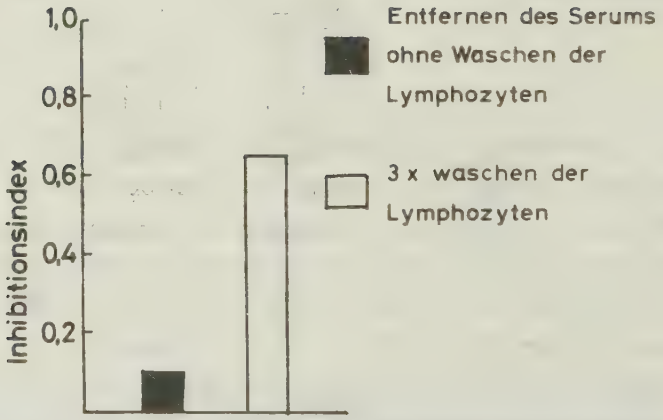


Abb. 34 Reversibilität des SIF-Effektes. Inhibitionsindex für das Standardserum SIF-IV nach
- Vorinkubation von 5×10^5 Lymphozyten in Röhrchen für 20 Stunden, Abpipettieren und Beginn der 48 Stunden-Stimulation durch Zusatz von Medium mit 10 µg PHA/ml und NS-Zusatz (schwarze Säule)
- oder 3-maligem Waschen der Lymphozyten mit 2 ml Medium vor Stimulationsbeginn (weiße Säule).

5. Titration der SIF-Aktivität

Durch Verdünnung SIF-positiver Seren sollte versucht werden, die SIF-Aktivität besser zu erfassen. Wie Abbildung 35 zeigt, hemmten Seren der Aktivität SIF-I (n = 2) bei einer Verdünnung von 1 : 2 nicht mehr die Lymphozytenstimulation.

Bei den Seren der Aktivität SIF-II (n = 6) war bei der Verdünnung 1 : 4 keine Aktivität mehr nachweisbar, während der mittlere Index der 9 Seren mit SIF-Aktivität III bei 0.46 ± 0.1 und der der 12 SIF-IV-Seren bei 0.2 ± 0.12 lag.

Bei der Verdünnung von 1 : 8 - entsprechend 2.5 % Serum im Kulturmedium - hemmten noch 5 der SIF-III Seren (Index = 0.64 ± 0.13), während für 7 Seren der SIF-IV Aktivität noch ein Index von 0.3 errechnet wurde (Index = 0.27 ± 0.13).

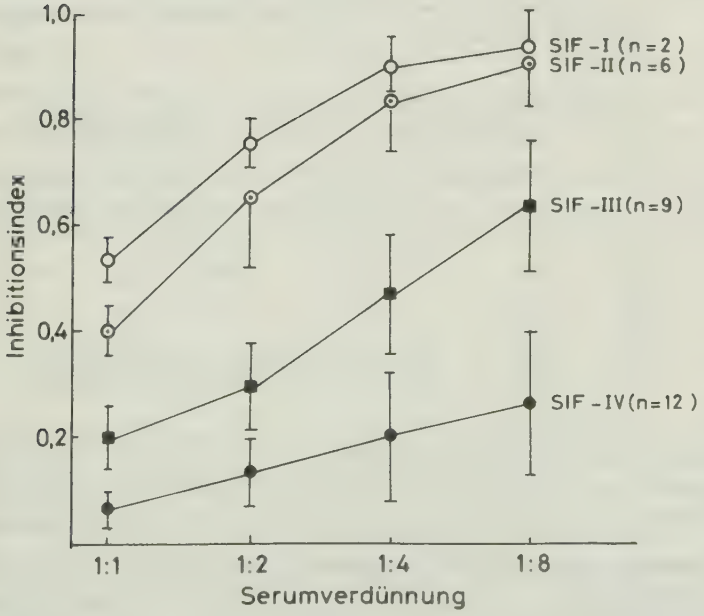


Abb. 35 Effekt einer Serumtitration beim SIF-Nachweis. Inhibitionsindizes ($\bar{x}$ ± SD) im Standardtest mit 15 % NS und Zusatz von 2 NS bzw. Seren der Aktivität SIF-IV (n = 12), SIF-III (n = 9), SIF-II (n = 6) und SIF-I (n = 2) in Konzentrationen von 20 % (1 : 1), 10 % (1 : 2), 5 % (1 : 4) bzw. 2.5 % (1 : 8).

In einem Falle wurde ein Serum der SIF-IV Aktivität bis zu 1 : 25 verdünnt (entsprechend 0.8 % Serum in der Kultur). Die Indizes bis zu einer Verdünnung von 1 : 8 entsprachen den Werten in Abb. 35 (SIF-IV). Bei einer Verdünnung von 1 : 15 betrug der Index 0.43, bei Verdünnung von 1 : 20 lag er bei 0.5 und nach 1 : 25 Verdünnung bei 0.6.

In Tabelle 10 wird die jeweilige SIF-Aktivität von Seren der Aktivität SIF-II, III und IV (im Standardtest) in Abhängigkeit von der Serumverdünnung, Mitogenkonzentration und der Einwirkungszeit auf die Lymphozytenstimulation verglichen.

Tabelle 10 Differenzierung der SIF-Aktivität. Seren der Aktivität SIF-II, III, IV wurden bei einer Verdünnung von 1 : 2, 1 : 4 und 1 : 8, bei einer Mitogenkonzentration von 30 µg PHA/ml getestet, 12 Stunden nach Beginn der Lymphozytenstimulation zugesetzt oder 12 Stunden nach Kulturbeginn entfernt (siehe Abb. 32 und 33). Verteilung der Seren nach SIF-Aktivität.

Kulturbedingung	Test mit Seren der Aktivität SIF-II				Test mit Seren der Aktivität SIF-III					Test mit Seren der Aktivität SIF-IV				
	Seren (n)	SIF-Aktivität 0	I	II	Seren (n)	SIF-Aktivität 0	I	II	III	Seren (n)	SIF-Aktivität I	II	III	IV
Serumverdünnung 1 : 2	6	3	3	-	9	-	-	5	4	12	-	-	6	6
Serumverdünnung 1 : 4		6	-	-		1	2	5	1		-	4	4	4
Serumverdünnung 1 : 8		6	-	-		4	3	2	-		2	3	4	3
Mitogen 30 µg/ml	6	1	4	1	9	-	1	4	4	8	-	-	3	5
Serumzugabe nach 12 Stunden	5	3	2	-	9	1	1	5	2	8	1	1	3	3
Serum-Entfernen nach 12 Stunden	5	2	3	-	9	1	3	5	-	5	1	1	2	1

Die geringste Streubreite wiesen 12 Seren der Aktivität SIF-IV auf, von denen noch 3 bei einer Verdünnung von 1 : 8 die gleiche Aktivität hatten. Nur zwei Seren lagen bei dieser Verdünnung im Aktivitätsbereich I.
Seren der Aktivität SIF-III zeigten eine wesentlich stärkere Streuung. Nur ein Serum von 9 hatte bei einer Verdünnung von 1 : 4 den gleichen Aktivitätsgrad, während 3 Seren nicht mehr oder nur schwach hemmten und 5 Seren einen Index der SIF-Aktivität II aufwiesen. Bei der 1 : 8 Verdünnung hemmten 4 Seren nicht mehr und nur für zwei Seren ergab sich eine Aktivität SIF-II.
Alle Seren mit SIF-Aktivität II waren bei einer Verdünnung von 1 : 4 ohne hemmenden Effekt.
Die Befunde zeigen, daß eine exakte Aktivitätsbestimmung erst durch Titration möglich ist.

Die Erhöhung der Mitogenkonzentration von 10 auf 30 µg PHA/ml entsprach etwa dem Effekt einer Serumverdünnung von 1 : 2.
Zusatz der Seren nach 12 Stunden Lymphozytenstimulation ergab eine ähnliche Änderung der Aktivität wie etwa 1 : 4 Verdünnung, während der hemmende Effekt durch Entfernen der Seren nach 12 Stunden Kultur stärker abnahm. Die letzteren Teste zeigten die unterschiedlichen Aktivitäten der Seren weniger deutlich als die Serumverdünnung oder Steigerung der Mitogenkonzentration.

6. Temperaturabhängigkeit der SIF-Aktivität

Seren der SIF-Aktivität IV, II und I wurden entweder bei 56° C für 60 Minuten oder bei 70° C für 15 Minuten erhitzt und nach Zentrifugation auf ihre Aktivität getestet. Während die Vorbehandlung bei 56° C weder bei den stark noch bei den schwach hemmenden Seren zu wesentlichen Aktivitätsänderungen führte, ließ sich durch die 15 Minuten Inkubation bei 70° C eine vollständige Aufhebung der hemmenden Aktivität erzielen (Abb. 36 a).

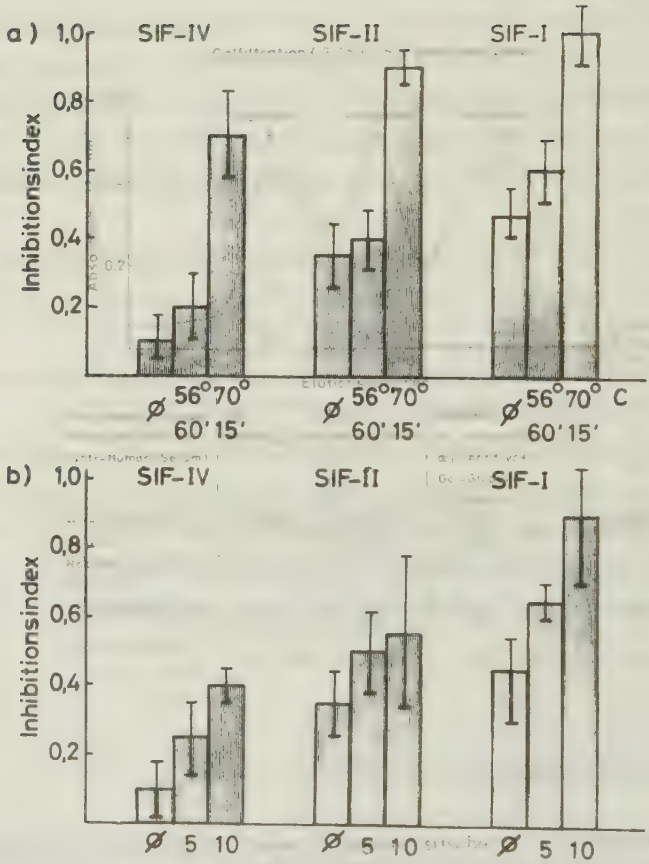


Abb. 36 Temperaturabhängigkeit der SIF-Aktivität.
Inhibitionsindizes ($\bar{x} \pm SD$) für vorbehandelte Seren unterschiedlicher SIF-Aktivität (IV, II, I).
Vorbehandlung:

a) Erhitzen der Seren auf 56° C für 60 Minuten bzw. 70° C für 15 Minuten; anschließend Zentrifugation bei 30 000 x g und Sterilfiltration,

b) 5- bzw. 10-maliges Einfrieren (-20° C) und Auftauen

Ferner wurden die gleichen Seren entweder 5-oder 10-mal eingefroren, bei 20° C aufgetaut und nach Zentrifugation getestet. 5-maliges Auftauen der Seren reduzierte den Inhibitionsindex um 0.1 - 0.2. Bei 10-maliger Wiederholung kam es beim Serum der Aktivität IV und II zu einem weiteren Aktivitätsverlust. Das SIF-I Serum hemmte nicht mehr die Lymphozytenstimulation (Abb. 36 b). Im Unterschied zum Erhitzen der Seren führte diese Behandlung zu einem geringeren Aktivitätsverlust.

7. Nachweis von SIF-Aktivität nach Molekularfiltration und chromatographischer Serumfraktionierung

Über die im Ablauf einer Immunantwort oder während einer Virusinfektion auftretenden Serumfaktoren liegen zahlreiche Beobachtungen vor und es war deshalb von Interesse zu prüfen, inwieweit SIF-Eigenschaften mit denen bereits besser definierter Faktoren übereinstimmen. Es wurden daher erste Versuche einer Charakterisierung unternommen.

Um den Molekulargewichtsbereich von SIF abgrenzen zu können, wurden SIF-Standardseren zunächst mit Molekularfiltern der Trenngrenze 50 000 zentrifugiert und anschließend Filtrat und Konzentrat getestet. Wie Abbildung 37 zeigt, ließ sich durch diesen Prozeß die SIF-Aktivität im Konzentrat eher erhöhen. Im Filtrat konnte dagegen keine eindeutige Hemmung festgestellt werden.

Darüber hinaus wurden 14 SIF-positive Seren der Aktivität II, III und IV über Nacht gegen 2-mal 5 Liter Hanks-Puffer dialysiert und nach Sterilfiltration untersucht. Nur in einem Falle erfolgte eine Aufhebung der Hemmung durch diese Behandlung (Index 0.4 zu 0.8).
Somit konnte angenommen werden, daß es sich bei den mit der SIF-Aktivität assoziierten Faktoren um höher molekulare Verbindungen (MG > 50 000) handelt.

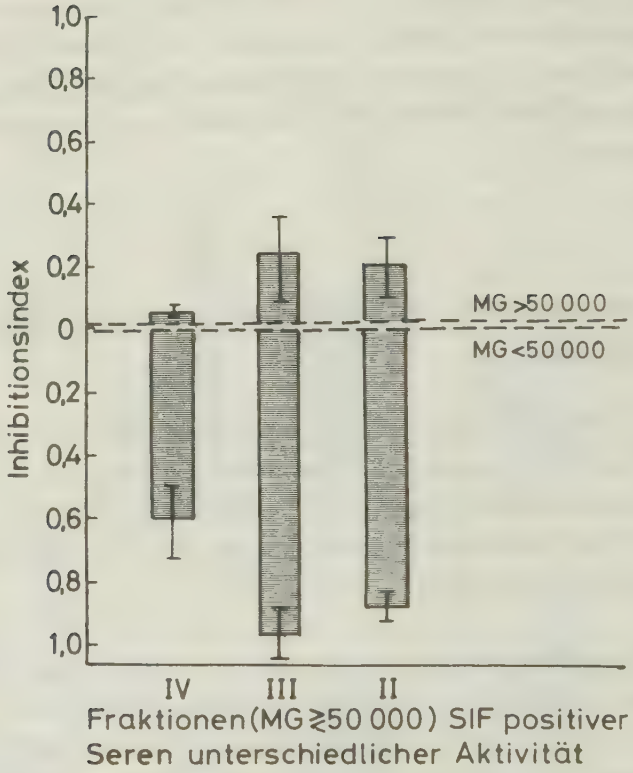


Abb. 37 SIF-Nachweis nach Molekularfiltration SIF^+ Seren der Aktivität SIF-IV (n = 1), SIF-III (n = 2) und SIF-II (n = 1) durch Filter der Trenngrenze MG 50 000 (Zentrifugation mit Centriflo-Membranhülsen bei 800 x g). Inhibitionsindizes ($\bar{x}$ + SD) für die Filtrate (MG < 50 000) (Säulen unterhalb der Trennlinie; inverse Skala) bzw. Konzentrate (Säulen oberhalb der Linie) im SIF-Standardtest.

Zwei Seren der SIF-Aktivität III und ein Normalserum wurden säulenchromatographisch aufgetrennt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 zusammengefaßt. Nach Gelfiltration mit Sephadex G-150 wurde bei beiden SIF-positiven Seren im Albuminpeak (F 3) eine gleich starke Inhibition wie im Ausgangsserum gefunden. Die Fraktion F 3 des Normalserums hemmte dagegen nicht. In der Immunelektrophorese (Abb. 39) waren mindestens 6 Präzipitationsbanden im Albumin- und α- und β-Globulinbereich erkennbar.

Während die IgG-Fraktionen (F 2) beider SIF-positiver Seren keine hemmende Aktivität zeigten, wurde die PHA-Stimulation in Gegenwart der Fraktion F 1 sowohl bei den SIF-positiven als auch bei dem Normalserum gehemmt. Da diese Fraktionen vor allem Makroglobuline enthielten (siehe Abb. 39), die auch in der schwach hemmenden Fraktion F 2 des Normalserums gefunden wurden, kann angenommen werden, daß dadurch die Hemmung zustande kam.

Diese Befunde sprechen dafür, daß die SIF-induzierte Hemmung durch Substanzen mit einem Molekulargewicht zwischen 50 000 und 120 000 Dalton bewirkt wird.

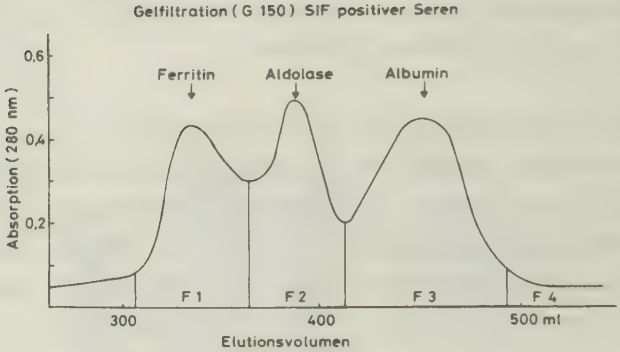
Die bisherigen Untersuchungen über die Eigenschaften von Seruminhibitionsfaktoren haben ergeben:

1. Bei der Inhibition der Mitogen-induzierten Stimulation normaler Lymphozyten durch Patientenserum handelt es sich um ein biologisches Phänomen, das reproduzierbar ist und weder durch die in vitro Bedingungen des Kultursystems noch durch die während einer Hepatitis auftretenden Entzündungsfaktoren wesentlich beeinflußt wird.

2. SIF wirken auf autologe, homologe und heterologe Lymphozyten. Auf proliferierende Ehrlich Ascites Tumorzellen haben die Faktoren keinen Einfluß.

3. SIF hemmen die Lymphozytenproliferation unabhängig von der Art des Mitogens und Antigens (PPD, MLR).

4. SIF bewirken eine Aufhebung oder Abschwächung der Leukozytenmigrationshemmung und interferieren mit der T-Rosettenbildung.



Immunelektrophorese Präzipitationslinien (anti-Human-Serum)	IgM α_2-Makroglobulin	IgG (Haptoglobulin)	ALBUMIN (α_1-saures Glykoprotein, α_1-Antitrypsin, Gc-Globulin, Transferrin)	∅
Molekulargewichts-bereich	>200 000	<200 000 >120 000	<120 000 >45 000	< 45 000
Nachweis von SIF-Aktivität				
SIF negatives Serum (0,9)	0,3	0,55	0,85	0,88
SIF positives Serum n=2 (0,25)	0,4 ±0,06	0,85 ±0,1	0,25 ±0,05	0,98 ±0,08

Abb. 38 Gelfiltration SIF$^+$ Seren. Charakteristisches Elutionsprofil eines SIF$^+$ Serums der SIF-Aktivität III nach Auftrennung an einer Sephadex G-150-Säule (3.5 x 90 cm; siehe B III 3.2). Elutionsvolumen von Ferritin, Aldolase und Albumin sind angegeben. Für die 3 Peaks (F1 - F3) sind die in der Immunelektrophorese (siehe Abb. 39) erkennbaren Präzipitationsbanden, ferner die mit Hilfe der Eichproteine ermittelten Molekulargewichtsbereiche und die Inhibitionsindizes für das SIF-negative Serum (NS) bzw. 2 SIF$^+$ Seren aufgeführt (Werte in Klammern sind die Indizes der nicht fraktionierten Seren).

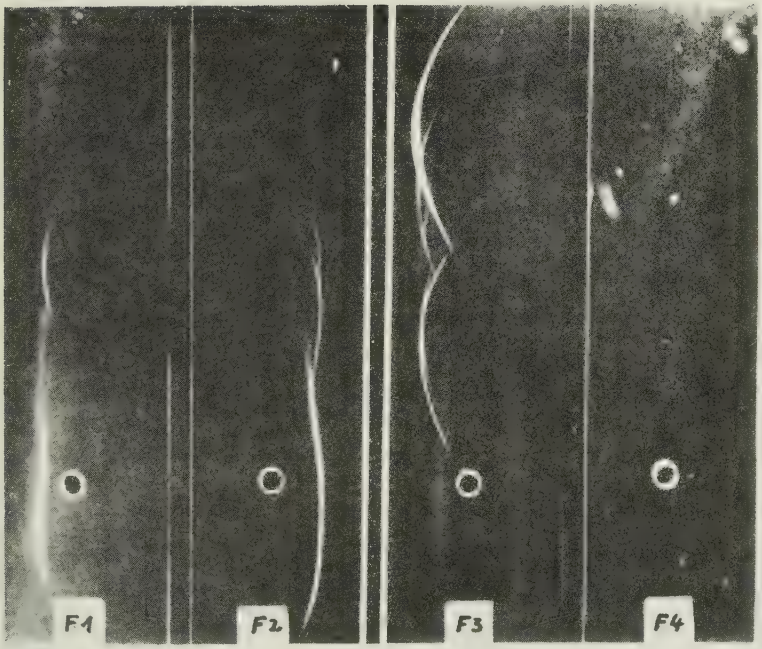


Abb. 39 Präzipitationslinien mit anti-Humanserum nach immunelek trophoretischer Auftrennung der durch Gelfiltration (siehe Abb. 38) gewonnenen Fraktionen F1 - F4 eines SIF$^+$ Serums (siehe B III 2.5). SIF-Aktivität befand sich in Fraktion F3, die kein IgG enthielt.

5. SIF beeinflußen die frühe Phase (< 20 Stunden) der Lymphozytenstimulation mit PHA und wirken wahrscheinlich durch direkten Kontakt mit der Lymphozytenoberfläche. Die Inhibition kann durch Waschen aufgehoben werden.

6. Der Molekulargewichtsbereich von SIF liegt nach der Methode der Gelfiltration zwischen 50 - 120 000 Dalton (Albuminpeak).

IV UNTERSUCHUNGEN ZUR KLINISCHEN RELEVANZ VON SERUMINHIBITIONSFAKTOREN

Die prognostische Beurteilung der protrahiert verlaufenden oder chronischen Hepatitis ist weder durch morphologische noch durch klinisch-biochemische Parameter eindeutig möglich. Die Beobachtung, daß Serumhemmfaktoren in der Inkubationszeit der akuten Virushepatitis, d.h. bereits vor Auftreten entzündlicher Phänomene, nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 17, S. 56) und bei progressiv verlaufender Hepatitis persistierten, veranlaßte uns zu prüfen, ob der SIF-Nachweis für die Beurteilung des klinischen Verlaufes einer Hepatitis von Bedeutung ist.

Deshalb wurden Verlaufsstudien an Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis (CPH), chronisch aktiver Hepatitis (CAH) und Leberzirrhose (LC) sowie Patienten mit juveniler lupoider Hepatitis durchgeführt. Die Untersuchungen sprechen dafür, daß eine persistierende SIF-Aktivität ein Zeichen für Progression der Hepatitis ist, während bei einer Remission die Hemmung meist fehlte. Bei einigen Patienten war der SIF-Nachweis negativ, bevor histologisch eine inaktive CAH vorlag.

1. Klinische Relevanz des SIF-Nachweises bei Patienten mit HB_s Ag-positiver Hepatitis und Leberzirrhose

Insgesamt wurden 159 Patienten mit der histologischen Diagnose einer chronischen Hepatitis untersucht. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse bei den Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis, chronisch aktiver Hepatitis und Leberzirrhose den Befunden bei Patienten mit akuter Virushepatitis gegenübergestellt.
Seren von 15 der 21 Patienten mit CPH hemmten nicht die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation und nur bei 2 Patienten fand sich eine SIF-Aktivität III.

Von den 56 Patienten mit aktiver CAH wiesen Seren von 20 Patienten (32 % der getesteten Seren; siehe Tabelle 11) eine SIF-Aktivität I/0 auf im Vergleich zu 19 von 31 Patienten mit inaktiver CAH (77 % der getesteten Seren). Seren der Aktivität SIF-III/IV fanden sich bei 17 Patienten (40 % der Seren) mit aktiver gegenüber 5 Patienten (12 % der Seren) mit inaktiver CAH.
Vergleichbare Befunde ergaben sich bei den Patienten mit Leberzirrhose. Bei 36 Patienten mit aktiver Leberzirrhose hemmten Seren von 14 Patienten (55 % der Seren) mit einer SIF-Aktivität III oder IV im Vergleich zu 3 der 15 Patienten (19 % der Seren) mit inaktiver Leberzirrhose.

Tabelle 11 SIF-Nachweis bei 159 Patienten mit chronischen Leberkrankheiten (422 Seren) sowie 21 Patienten mit akuter Virushepatitis (81 Seren)

Anzahl Patienten (getestete Seren)	% HB_sAg positiv	Diagnose		SIF-AKTIVITÄT mittlerer Inhibitionsindex der getesteten Seren	Aktivitätsgrad (% Seren) 0	I	II	III	IV
21 (44)	81	AVH	1.-2. Woche	0.36 ± 0.18	14	14	34	30	9
(37)			6.-8. Woche	0.76 ± 0.1	78	19	3	-	-
21 (89)	100	CPH		0.75 ± 0.25	88	4	6	2	-
56 (108)	60	CAH	aktiv	0.4 ± 0.23	21	11	28	23	17
31 (85)			inaktiv	0.66 ± 0.2	56	21	11	8	4
36 (103)	55	LC	aktiv	0.35 ± 0.2	18	10	17	44	11
15 (37)			inaktiv	0.55 ± 0.17	27	22	32	14	5

Tabelle 12 und 13 zeigen die Änderung der SIF-Aktivität im Verlauf von 18 - 48 Monaten bei 11 Patienten mit HB_sAg-positiver CAH und 9 Patienten mit Leberzirrhose, wobei die Erstdiagnosen mit den Diagnosen am Ende der Beobachtungszeit verglichen sind.
In 5 Fällen kam es zu einer Normalisierung der Serumaktivität (SIF-0), in 3 weiteren Fällen bestand von Beginn der Beobachtung an keine hemmende Aktivität im Serum (Tabelle 12). Bei 7 dieser Patienten blieb die Hepatitis stationär; histologisch besteht jetzt eine inaktive chronische Hepatitis oder die Krankheit heilte aus (R.B.). Nur in einem Fall (D.R., siehe Abb. 43) kam es zu einem Übergang in Leberzirrhose trotz ständig fehlender SIF-Aktivität.
In den restlichen 3 Fällen fand sich über einen Zeitraum von 18 bis 42 Monaten eine konstante Hemmung der Seren mit Indizes zwischen 0.1 - 0.55, obwohl bei 2 dieser Patienten heute die Diagnose einer CPH und nur bei dem dritten Patienten (J.H.S., siehe Abb. 41) eine aktive Form der CAH vorliegt.

Bei den 9 Patienten mit HB_sAg-positiver Leberzirrhose bestand eine bessere Korrelation zwischen SIF-Nachweis und histologischer Diagnose als bei den Patienten mit CAH (Tabelle 13). 3 Patienten (N.L., H.R., M.H.) mit starker SIF-Aktivität (SIF-IV, III) starben 24 - 36 Monate nach Beginn der Verlaufsbeobachtung an den Folgen einer Leberzirrhose. Nur 2 Patienten waren in dem beobachteten Zeitraum von 48 Monaten SIF-negativ. Bei dem einen Patienten (E.K.) besteht jetzt eine inaktive CAH (II a), bei dem anderen ist der Leberprozeß noch aktiv (S.B.). In den übrigen 4 Fällen war bei den Verlaufskontrollen in den Patientenseren eine Hemmung mit Indizes zwischen 0.1 und 0.55 nachweisbar.

In der Tabelle 14 ist das Verhalten der SIF-Aktivität der Patientengruppen zu Beginn und am Ende der Verlaufsbeobachtung mit der Enddiagnose verglichen. Von den 7 Patienten mit CPH waren 4 zu Beginn und alle am Ende der Verlaufskontrollen SIF-negativ. Bei der aktiven CAH hemmten die Seren von einem der 2 Patienten weder zu Beginn noch am Ende der Verläufe, während von den 9 Fällen mit heute inaktiver Form der Erkrankung anfangs 2 und zum Schluß 6 SIF-

Tabelle 12 SIF-Verlaufsbeobachtung an 11 Patienten mit HB_sAg-positiver CAH

Patient (Klinik)	Geschlecht Geburtsjahr	Erst-Manifestation	Diagnose bei Beginn der Verlaufsbeobachtung	SIF-Nachweis (Index) im Beobachtungszeitraum (Monate nach Beginn) 6	12	18	24	30	36	42	48	Zahl der getesteten Seren	jetzige Diagnose (letzte)
R.B. Med. Klinik Tü	w 1939	Febr. 1968 AVH	CAH II a April 1972	0.25	-	-	-	-	-	0.7	-	4	ausgeheilt
A.M. DRK Hamburg	m 1928	Juli 1973 CAH	CAH Aug. 1973	0.75	-	0.85	-	0.95	0.9	-	0.85	5	CPH
W.H. DRK Hamburg	m 1937	März 1973 AVH	CAH Nov. 1973	0.65	0.7	0.7	-	-	-	0.8	0.95	7	CPH
H.S.W. DRK Hamburg	w 1946	Sept. 1973 CAH II a	CAH II a Nov. 1973	0.55	0.3	0.6	-	0.35	0.55	0.4	0.75	10	CPH
M.R. DRK Hamburg	m 1946	Juli 1973 AVH	protr. verl. Hep. Dez. 1973	0.55	0.55	-	0.35	0.5	-	-	-	7	CPH (früher CAH)
W.E. Khs Karlsruhe	m 1935	Sept. 1974 AVH	CAH II b Sept. 1975	0.2	0.4	0.4	-	-	-	-	-	4	CPH
R.W. DRK Hamburg	m 1929	Nov. 1970 CAH II a	CAH II a Nov. 1973	0.6	-	0.9	-	1.0	0.8	0.95	0.95	6	CAH II a
A.H. DRK Hamburg	m 1903	April 1969 CAH	CAH II a Nov. 1972	0.6	0.65	-	0.75	-	-	-	1.0	4	CAH II a
A. Sch. Med. Klinik Tü	w 1932	März 1975 AVH	protr. verl. AVH April 1975	0.8	0.9	0.8	0.7	0.7	-	-	-	21	CAH II a
J.H.Sh. DRK Hamburg	w 1947	Nov. 1973 subak. VH	CAH II b Juni 1974	0.1	0.5	0.15	-	-	0.35	-	-	7	CAH II b
D.R. Med. Klinik Tü	m 1937	Jan. 1975 AVH	protr. VH Mai 1975	0.75	0.7	0.65	0.7	0.8	-	-	-	17	† Jan. 1978 (Aneurysmablutung) CAH II b

Tabelle 13 SIF-Verlaufsbeobachtungen an 9 Patienten mit HB_sAg-positiver Leberzirrhose bzw. CAH mit Leberzirrhose

Patient	Geschlecht Geburtsjahr	Erst-Manifestation	Diagnose bei Beginn der Verlaufsbeobachtung	SIF-Nachweis (Index) im Beobachtungszeitraum (Monate nach Beginn) 6	12	18	24	30	36	42	48	Zahl der getesteten Seren	jetzige Diagnose (letzte)
N.L. Med.Klinik Tü	m 1927	Sept. 1974 CAH mit LC	CAH mit LC Sept. 1974	0.25	0.3	0.15	0.15					15	April 1976 ⊕ CAH mit LC
H.R. Med. Klinik Tü	w 1941	Jan. 1968 LC	LC Febr. 1971	0.05	-	-	-	-	0.15			5	Sept. 1973 ⊕ LC
M.H. Med.Klinik Tü	w 1905	Okt. 1969 CAH mit LC	CAH mit LC Dez. 1972	0.05	-	-	0.05					2	Mai 1974 ⊕ LC
A.B. DRK Hamburg	m 1912	1933 AVH	LC Okt. 1973	0.2	0.2	-	0.15	-	0.2	-	0.2	5	LC
D.H. Khs Schleswig	m 1911	Aug. 1972 CAH	CAH mit LC Febr. 1973	0.2	-	-	0.15	-	-	-	0.2	3	CAH mit LC
A.L. DRK Hamburg	w 1918	Dez. 1971 LC	LC Mai 1973	0.5	-	0.3	-	0.35	0.1	0.5		6	gering aktive LC
S.B. DRK Hamburg	w 1942	März 1973 AVH	CAH II b mit LC Okt. 1973	0.7	0.8	0.8	-	1.0	0.8	0.8	0.75	11	CAH II b mit LC
K.L. DRK Hamburg	w 1947	Dez. 1967 AVH	CAH mit LC Febr. 1973	0.4	0.45	-	0.5	-	-	0.55	0.45	5	CAH II a
E.K. DRK Hamburg	m 1927	Jan. 1972 CPH	CAH mit LC Nov. 1972	0.75	0.6	0.65	-	0.75	-	0.8	0.95	6	CAH II a

negativ waren. Bei den 9 Patienten mit Leberzirrhose zeigte sich keine wesentliche Änderung der SIF-Aktivität im Beobachtungszeitraum.

Tabelle 14 Verlaufskontrolle bei 27 Patienten mit HB_sAg-positiver chronischer Leberkrankheit nach 1,5 - 6 Jahren Beobachtungszeitraum

heutige Diagnose		Anzahl Patienten		SIF-Index zu Beginn (a) und am Ende (b) der Verlaufskontrolle 0	I	II	III	IV	Mittelwert	Beobachtungszeit (Monate)
CPH		7	a	4	1	1	-	1	0.6 ± 0.28	18 - 66
			b	7	-	-	-	-	0.8 ± 0.2	
CAH	aktiv	2	a	1	-	-	-	1	0.4 ± 0.4	30; 36
			b	1	-	1	-	-	0.55 ± 0.3	
	inaktiv	9	a	2	5	-	2	-	0.55 ± 0.2	18 - 48
			b	6	1	2	-	-	0.75 ± 0.25	
LC	aktiv	7	a	1	-	1	3	2	0.25 ± 0.25	24 - 48
			b	1	-	1	4	1	0.25 ± 0.25	
	inaktiv	2	a	1	-	1	-	-	0.6 ± 0.25	48
			b	1	-	1	-	-	0.7 ± 0.3	

Die Häufigkeit der Übereinstimmung zwischen SIF- und histologischer Aktivität bei den Patienten mit den verschiedenen Formen chronischer Hepatitis ist aus Tabelle 15 zu ersehen. Bei den Patienten mit CAH, einer Krankheit, die klinisch und histologisch nicht einfach zu beurteilen ist, war die Korrelation mit 64 % schlechter als bei den Patienten mit Leberzirrhose (78 %) und CPH (100 %).

Tabelle 15 Korrelation zwischen SIF- und histologischer Aktivität bei 27 Patienten mit chronischer HB_sAg-positiver Hepatitis am Ende des beobachteten Zeitraums von 1.5 - 5 Jahren

Diagnose	Anzahl Patienten	Übereinstimmung der Aktivität von SIF und Histologie Anzahl (Prozent)		Diskrepanz SIF/Histologie SIF+ /Hist.Ø	SIF Ø /Hist.+
CPH	7	7	(100)	-	-
CAH	11	7	(64)	3	1
LC	9	7	(78)	1	1

In Tabelle 16 sind die wesentlichen virologischen und serologischen Befunde dieser Patienten aufgeführt. Bei allen Patienten bestanden Hinweise auf Zustand nach B-Hepatitis, bei 10 Patienten konnten Autoantikörper gegen Kerne und/oder glatte Muskulatur festgestellt werden.

Tabelle 16 Aufnahme-Diagnosen, virologische und serologische Befunde der im Verlauf einer chronischen HB_sAg-positiven Hepatitis untersuchten 27 Patienten

Diagnose	Anzahl Patienten	Alter	Geschlecht m / w	HBV-Antigene/Antikörper HB_sAg/aHB_s	aHB_c	e-Ag* anti-e	Auto-AK ANA/SMA
CPH	7	49 ± 13	3 / 4	7 / 0	7	3 / 0	0
CAH	11	40 ± 12	7 / 4	9 / 2	11	3 / 1	5
LC	9	47 ± 14	5 / 4	7 / 1	9	3 / 0	5

* Nachweis mit Hilfe der Immundiffusion

Es sind noch einige typische klinische Verläufe aufgezeichnet. Bei der Patientin L.D. (Abb. 40) bestand bereits sehr frühzeitig eine Übereinstimmung zwischen der guten Prognose einer CPH und dem negativen SIF-Befund, obwohl aufgrund der lange Zeit erhöhten Transaminasen (GOT)-Werte an einen Übergang in eine chronisch aktive Hepatitis gedacht werden mußte. Durch die Laparaskopie (1975) konnte ein Leberumbau ausgeschlossen werden und die Diagnose der CPH erneut bestätigt werden.

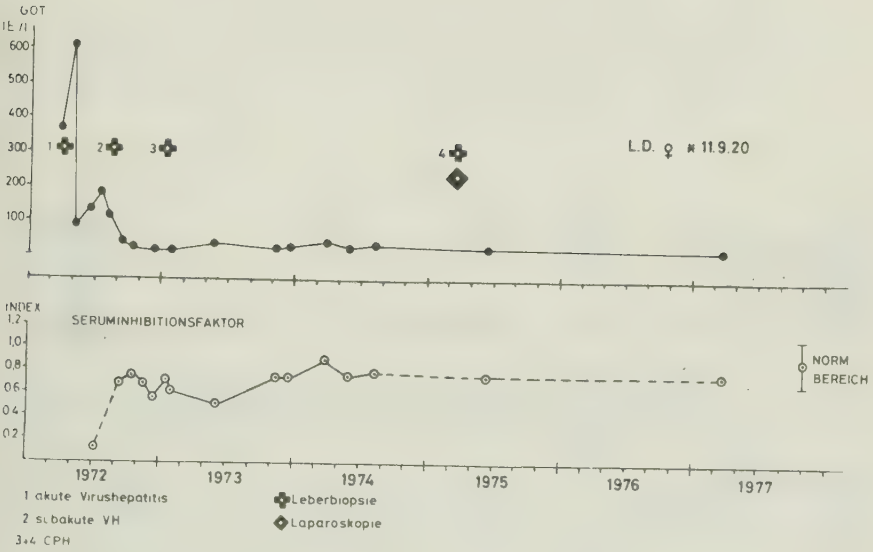


Abb. 40 Verlaufsbeobachtung bei einer Patientin mit HB_sAg-positiver chronisch persistierender Hepatitis

In Abbildung 41 wird der Verlauf einer Patientin (S.J.H.) mit CAH gezeigt. Im November 1973 erkrankte die Patientin an einer anikterischen subklinisch verlaufenden HB_sAg-positiven Hepatitis. Aufgrund der Persistenz des HB_sAg wurde im Juli 1974 eine Leberbiopsie und Laparaskopie durchgeführt, bei der eine aktive CAH (II b) festgestellt wurde. Transaminasen- und Bilirubinwerte waren normal, während die Immunglobulinkonzentration erhöht war (28 rel.%). Wiederholt durchgeführte Kontrollbiopsien und eine weitere Laparaskopie führten zu keiner eindeutigen Klärung. In dieser Beobachtungszeit (1974/75) war eine SIF-Aktivität stets nachweisbar.

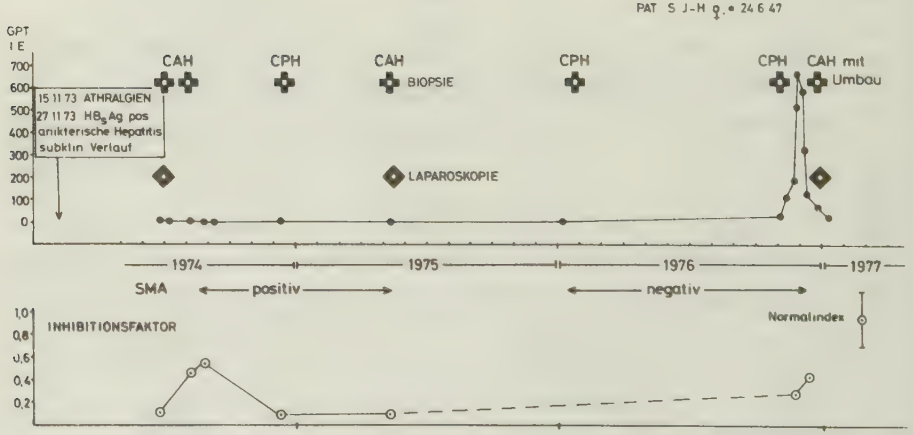


Abb. 41 Verlaufsbeobachtung bei einer Patientin mit HB_sAg-positiver chronisch aktiver Hepatitis

Eine weitere Kontrollbiopsie im November 1976 zeigte das Bild einer CPH. Zu dieser Zeit waren die Transaminasenwerte erhöht (um 200 IE/l) und mit einem Index von 0.3 SIF nachweisbar. Kurz darauf bekam die Patientin einen Schub, wobei jetzt histologisch die Diagnose einer chronisch aktiven Hepatitis gestellt wurde. Eindrucksvoll an diesem Verlauf ist die lange Zeit bestehende stark positive SIF-Aktivität bei völlig normalen Transaminasewerten.

In Abbildung 42 ist der 5-jährige Verlauf einer Patientin (A. L.) mit Leberzirrhose dargestellt. Seren zur SIF-Bestimmung standen uns seit 1973 zur Verfügung und zeigten in allen Fällen eine hemmende Aktivität mit einem Index zwischen 0.1 und 0.5. Die GOT-Werte schwankten zu dieser Zeit zwischen 20 - 100 IE/l, das Bilirubin war nicht erhöht, die Immunglobulinkonzentrationen waren normal oder leicht erhöht. Auch jetzt besteht noch eine mäßig aktive Leberzirrhose.

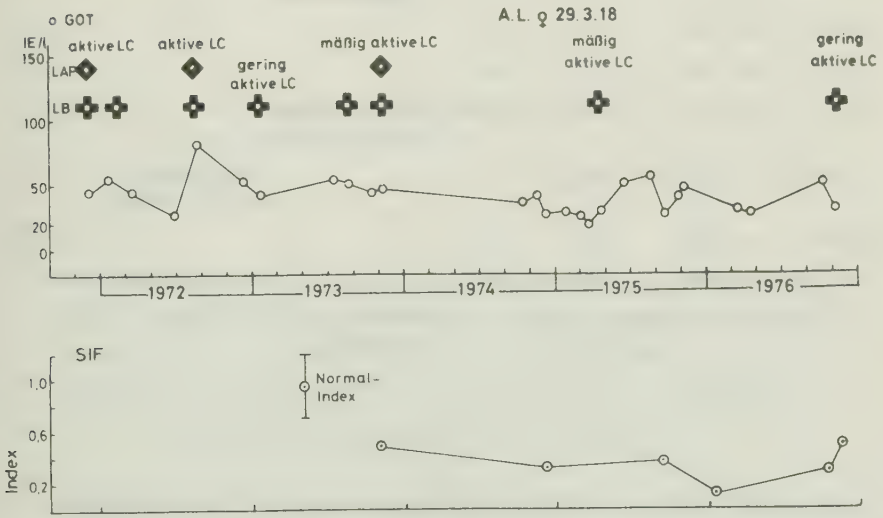


Abb. 42 Verlaufsbeobachtung bei einer Patientin mit HB_sAg-positiver Leberzirrhose

Tabelle 17 zeigt eine progressiv verlaufende CAH mit Übergang in Leberzirrhose (N.L.). Trotz mäßiger Transaminasenerhöhung und niedrigen Bilirubinwerten ließen sich in allen 15 getesteten Seren des Patienten eine starke Hemmung mit Indizes zwischen 0.1 und 0.35, unabhängig von der Durchführung einer immunsuppressiven Therapie, nachweisen. Zwei Jahre nach Beginn der Verlaufskontrollen starb der Patient im Leberkoma.

Tabelle 17 Progressiv verlaufende HB_sAg-positive CAH mit Leberzirrhose (N.L. * 5.1.1927)

Datum	GOT/GPT (IE/l)	Bilirubin (µmol/l)	Immunglobulin (mg%)	Leberhistologie	Immunsuppressive Therapie	SIF (Mittelwert)
9/1974	47 / 34	24	33	CAH mit Übergang in Leberzirrhose		0.25
2/1975	38 / 35	17	-		ø	0.30
6/1975	40 / 28	12	41			0.15
2/1976	57 / 41	24	33	CAH mit Übergang in Leberzirrhose		0.20
3/1976	98 / 91	246			40 mg Steroide 100 mg Azathioprin	0.10
3/1976	16 / 30	89	33			0.20
4/1976	240 /380	239	28		30 mg Steroide	0.10
4/1976	⊞ Leberkoma			CAH mit Leberzirrhose		

In einigen Fällen ließ sich keine Übereinstimmung zwischen SIF- und histologischer Aktivität feststellen. So konnten wir von 1975 bis 1977 den Verlauf eines Patienten (D.R.; Abb. 43) kontrollieren. Während zu keinem Zeitpunkt eine eindeutige Hemmung in den Seren festgestellt werden konnte, kam es klinisch-histologisch zum

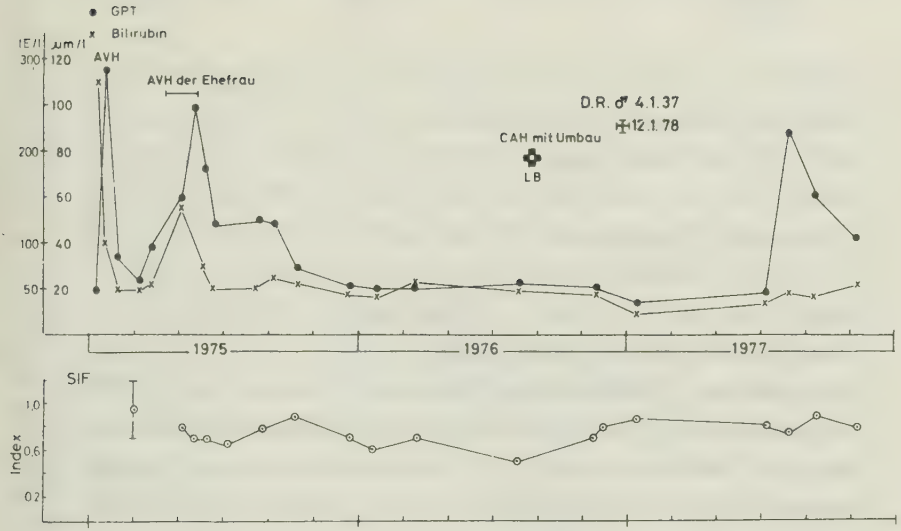


Abb. 43 Verlaufsbeobachtung bei einem Patienten mit HB_sAg-positiver chronisch aktiver Hepatitis

eindeutigen Bild einer CAH mit Anstieg der Immunglobuline. Im August 1976 waren histologisch Umbauvorgänge und eine mäßig aktive CAH erkennbar und ein Jahr später kam es zu einem Schub. Im Januar 1978 starb der Patient plötzlich an einer Aneurysmablutung der Arteria cerebri media. Bei der Autopsie wurde die Diagnose der aktiven CAH mit Leberzirrhose gesichert.

2. Klinische Relevanz des SIF-Nachweises bei Patienten mit juveniler lupoider Hepatitis

8 Patienten (2 ♂, 6 ♀), die im Durchschnittsalter von 15 Jahren an einer Hepatitis erkrankten, wurden über einen Zeitraum von 1.5 - 6 Jahren untersucht. Bei allen Patienten lag bei Beginn der Erkrankung entweder die histologische Diagnose einer akuten oder bereits chronisch aktiven Hepatitis vor (Tabelle 18) mit ausgeprägter Hypergammaglobulinämie. Hinweise auf Zustand bei oder nach einer Virus-(A-, B-)Infektion bestanden nicht (HB_sAg-, aHB_s-, aHA-negativ). Dagegen ließen sich in allen Seren Antikörper gegen glatte Muskulatur, Kernantigen und DNS nachweisen (siehe Tabelle 2, S. 13).
Das Verhalten der SIF-Aktivität in den beobachteten Zeiträumen von 18 - 72 Monaten und die histologische Diagnose zu Beginn und am Ende der Verlaufsbeobachtung sind in Tabelle 18 aufgezeigt. Alle Patienten standen unter einer immunsuppressiven Therapie. In allen Fällen kam es zu einer Aufhebung der anfangs meist stark ausgeprägten hemmenden Aktivität.

In Abbildung 44 ist das Verhalten der SIF-Aktivität im Ablauf der chronischen Hepatitis unter der immunsuppressiven Therapie bei den Patienten dargestellt. Die im ersten Jahr stark nachweisbare Inhibition nahm in den folgenden Jahren kontinuierlich ab. 3 Jahre nach Krankheitsbeginn betrug der mittlere Inhibitionsindex 0.7 ± 0.14.

Ein typischer Verlauf einer juvenilen lupoiden Hepatitis ist in Abb. 45 dargestellt. Der Junge (R.D.) erkrankte im Alter von 10 Jahren mit den klinischen Zeichen einer akuten Hepatitis. Die Transaminasenwerte waren bis ungefähr 900 IE/l angestiegen, dagegen war Bilirubin mit 100 µM nur mäßig erhöht. Atypisch für eine akute Virushepatitis waren die stark erhöhten Immunglobulinwerte (45 rel.%) sowie die hochtitrigen Antikörper gegen glatte Muskulatur. Jeweils nach Reduktion der Steroiddosis kam es zu Schüben. Im August 1975 war erstmals die früher stark positive SIF-Aktivität nicht mehr nachweisbar. Auch histologisch zeigte sich eine deutliche Besserung und die im April 1977 gewonnene

Tabelle 18 SIF-Verlaufsbeobachtung an 8 Patienten mit juveniler lupoider Hepatitis über einen Zeitraum von 1.5 – 6 Jahren

Patient (Klinik)	Geschlecht Geburtsjahr	Erst-Manifestation	Diagnose bei Beginn der Verlaufsbeobachtung	SIF-Bestimmungen (Index) im Beobachtungszeitraum (Monate nach Beginn) 6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	Zahl d. getest. Seren	jetzige Diagnose (letzte)
R.D. Kinderkl. Tü	♂ 1962	Febr. 1972 akute Hepatitis	aktive LC Jan. 1973	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.9	0.8	0.85	0.8	1.0			17	inaktive CAH ohne LC, klin. in Remission
H.F. Med. Klinik Tü	♂ 1957	Jan. 1972 akute Hepatitis	schwere akute Hepatitis Febr. 1972	0.25	0.2	0.35	-	0.4	0.5	-	0.9	1.0	0.9	0.8	0.7	22	LB o. B. klinisch noch aktive CAH
M.B. Med. Klinik Tü	♀ 1955	Juli 1972 akute Hepatitis	CAH mit LC Jan. 1973	0.3	0.45	0.55	0.6	-	0.6	-	-	0.8				18	inaktive CAH klin. in Remission
U.W. DRK Hamburg	♀ 1958	Juni 1973 Hepatitis	CAH Juli 1973	0.4	0.45	0.55	0.5	0.8	0.85	-	0.9					10	gering aktive LC klin. inaktiv
R.M.D. Kinderkl. Tü	♀ 1960	April 1974 CAH	aktive Hepatitis mit Umbau Mai 1974	0.2	0.35	0.4	0.45	0.4	0.45	0.7						14	CAH klinisch in Remission
E.G. Kinderkl. Ulm	♀ 1961	Nov. 1974 Hepatitis	CAH mit Umbau Jan. 1975	0.7	0.4	-	0.6	0.8	0.75							14	CAH klin. inaktiv
R.W. Krh. Starnberg	♀ 1962	Okt. 1975 Hepatitis	CAH mit Umbau Nov. 1975	0.15	0.2	0.2	0.85									11	inaktive CAH klin. in Remission
K.B. Städt. Krh. München	♀ 1950	März 1974 Hepatitis	mäßig aktive Hepatitis Nov. 1974	0.3	-	0.65										4	inaktive CAH klinisch in Remission

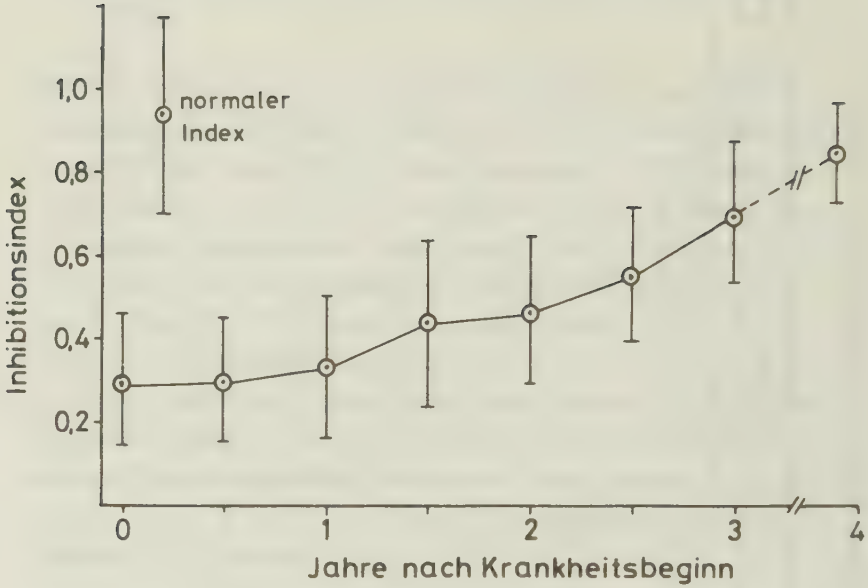


Abb. 44 Verhalten der SIF-Aktivität bei 8 Patienten mit juveniler lupoider Hepatitis im Verlauf von 4 Jahren nach Krankheitsbeginn. Mittlere Inhibitionsindizes ($\bar{x} \pm SD$) der pro Halbjahr getesteten Patientenseren

Leberbiopsie zeigte das Bild einer inaktiven CAH. Obwohl der Patient seit August 1976 keine Steroide mehr erhielt, ist es bisher nicht zu neuen Schüben gekommen.

Einen ähnlichen Verlauf konnten wir bei einer Patientin (R.W., Abb. 46) beobachten, die im Oktober 1975 im Alter von 13 Jahren erstmals an einer Hepatitis erkrankte. Die Leberbiopsie zeigte das Bild einer CAH mit Umbau. Serologisch bestand die typische Konstellation einer lupoiden Hepatitis. Die Patientin wurde seit Beginn der Hepatitis immunsuppressiv behandelt. Wie die Abbildung zeigt,

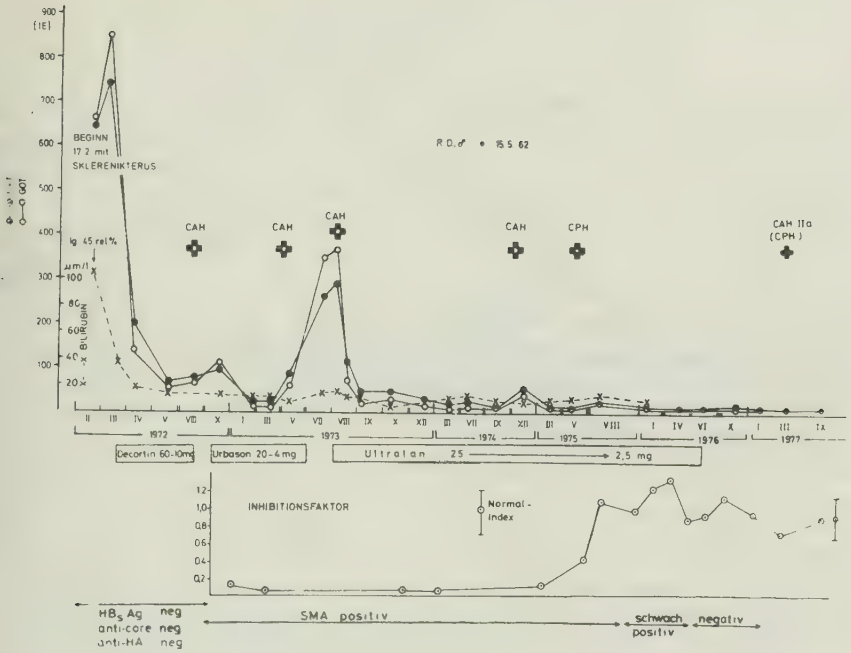


Abb. 45 Verlaufsbeobachtung bei einem Patienten mit juveniler lupoider Hepatitis

war die hemmende Aktivität bis April 1977 stark ausgeprägt mit Indizes zwischen 0.1 - 0.45 (mit Ausnahme des ersten Serums). Bei diesem Verlauf ist von Bedeutung, daß im September 1976 erstmals Antikörper gegen HB_sAg und HB_cAg auftraten und zwar zu einem Zeitpunkt, der klinisch wie ein Schub einer lupoiden Hepatitis erschien. Dieser Befund muß so gedeutet werden, daß sich die Patientin während eines Klinikaufenthaltes mit dem Hepatitis B-Virus infiziert hatte. Im Oktober 1977 war die SIF-Aktivität erstmals negativ. Heute ist die Patientin berufstätig, steht aber weiter unter immunsuppressiver Therapie.

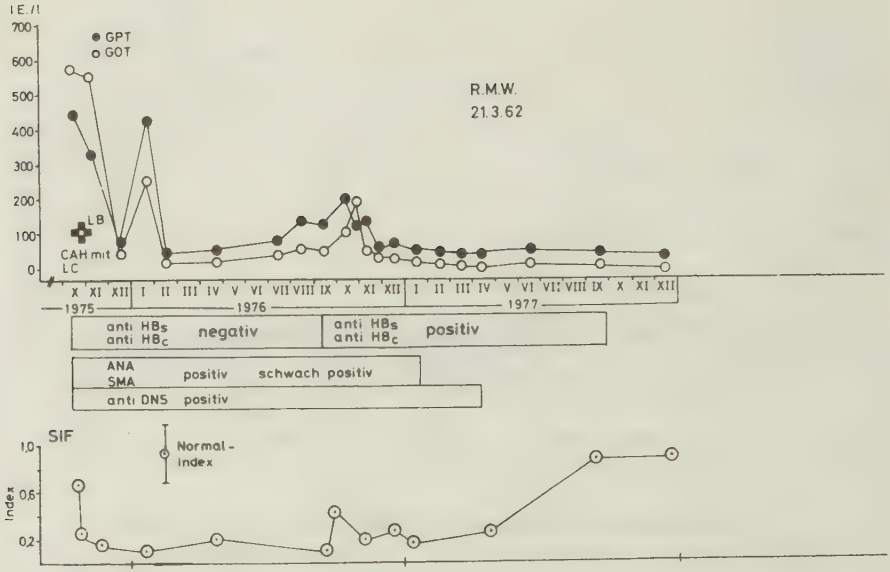


Abb. 46 Verlaufsbeobachtung bei einer Patientin mit juveniler lupoider Hepatitis

Im Gegensatz dazu konnten wir in Zusammenarbeit mit der Kinderklinik Tübingen den Krankheitsverlauf bei einem jungen Mädchen (R. D. M., Abb. 47) verfolgen, das im Mai 1974 mit den Zeichen einer lupoiden Hepatitis erkrankte. Unter der immunsuppressiven Therapie ließ sich zwar die entzündliche Aktivität unterdrücken, histologisch fand sich aber im März 1976 noch eine CAH mit Umbau und die Seren der Patientin hemmten deutlich. Mit Erhöhung der Imurek- und Steroiddosis im Januar 1977 konnte erstmals eine Besserung erzielt werden und auch die SIF-Aktivität nahm weiter ab.

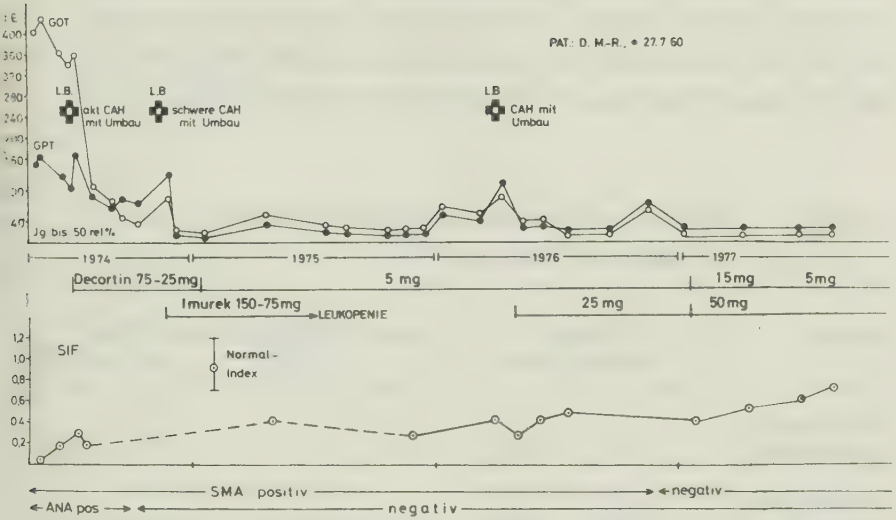


Abb. 47 Verlaufsbeobachtung bei einer Patientin mit juveniler lupoider Hepatitis

Diese Verlaufsbeobachtungen an Patienten mit juveniler lupoider Hepatitis sprechen dafür, daß der Nachweis einer starken SIF-Aktivität auf eine Progression der Erkrankung, das Verschwinden der SIF-Aktivität auf eine Remission hinweist, jedoch keine Aussagen hinsichtlich einer bestehenden Vollremission zuläßt. So bekam einer der 8 Patienten (H.F., siehe Tabelle 18), der seit 1972 kontrolliert wurde, seit Sommer 1975 keine SIF-Aktivität mehr zeigte und bei dem im Dezember 1976 ein unauffälliger histologischer Befund erhoben wurde, dennoch einen Schub nach dem Absetzen der immunsuppressiven Therapie im Juli 1977.

3. SIF-Nachweis bei anderen hepatischen und nicht hepatischen Erkrankungen

Seren von Patienten mit alkohol-toxischer Leberzirrhose, Hämochromatose und primärer biliärer Zirrhose wurden ferner auf SIF-Aktivität untersucht. Bei 20 von 35 Patienten (43 Seren, Tabelle 19) mit alkoholischer Leberzirrhose waren die Seren SIF-negativ oder hemmten nur schwach die Lymphozytenstimulation, während bei 6 Patienten (14 Seren) eine SIF-Aktivität III und IV gefunden wurde.

Tabelle 19 Nachweis von SIF-Aktivität bei Patienten mit hepatischen und nicht hepatischen Erkrankungen

Diagnose	Anzahl Patienten	(Seren)	SIF-Aktivität der getesteten Seren 0	I	II	III	IV	mittlerer Index
Alkohol-toxische Leberzirrhose	35	(74)	33	10	17	11	3	0.6 ± 0.25
Primäre biliäre Zirrhose	14	(24)	4	4	8	7	1	0.4 ± 0.25
Hämochromatose	3	(3)	3	-	-	-	-	0.75 ± 0.1
Kollagenosen	28	(43)	3	4	17	13	6	0.3 ± 0.2
Sarcoidose (M. Boeck)	8	(12)	4	4	3	1	-	0.6 ± 0.15
M. Crohn	9	(9)	4	1	3	1	-	0.6 ± 0.3
Herzinfarkt	15	(15)	15	-	-	-	-	1.0 ± 0.25

5 stark hemmende Seren wurden im Vergleich zu Seren gleicher SIF-Aktivität von Patienten mit HB_sAg-positiver CAH und Leberzirrhose titriert. Aus der Tabelle 20 geht hervor, daß die schwächer ausgeprägte Hemmung in den Seren von Patienten

Tabelle 20 Titration von 5 stark hemmenden Seren von Patienten mit alkoholtoxischer Leberzirrhose (a) und 10 Seren von Patienten mit HB_sAg-positiver CAH/Leberzirrhose (b)

Diagnose der Patienten	Serumverdünnung	SIF-Aktivität 0	I	II	III	IV
a) alkohol-toxische Leberzirrhose	1 : 1	-	-	-	2	3
	1 : 2	-	-	3	2	-
	1 : 4	2	2	1	-	-
	1 : 8	4	1	-	-	-
b) HB_sAg-positive CAH/ Leberzirrhose	1 : 1	-	-	-	4	6
	1 : 2	-	-	1	4	5
	1 : 4	1	-	4	2	3
	1 : 8	1	3	2	1	3

mit alkoholischer Leberzirrhose bei einer Verdünnung von 1 : 8 nur noch in einem Fall schwach nachweisbar war, während 4 der 10 Seren der Patienten mit HB_sAg-positiver CAH noch stark hemmten. Ähnlich verhielten sich die Seren bei einer Erhöhung der Mitogenkonzentration.

Seren von 3 Patienten mit Hämochromatose zeigten keine SIF-Aktivität, während in Seren bei 24 Patienten mit primärer biliärer Zirrhose unterschiedliche SIF-Aktivität gefunden werden konnte (Tabelle 19). Je 8 Seren hemmten stark (SIF-III, IV), deutlich (SIF-II) oder kaum (SIF-I, 0) im SIF-Test.

Unter den Patienten mit nicht hepatischen Erkrankungen hatten 28 Kollagenkrankheiten (Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis), 8 Sarcoidose, 9 Morbus Crohn und 15 Zustand nach Herzinfarkt. Einheitlich verhielten sich nur die Patienten mit Herzinfarkt, bei denen keine Hemmung gefunden wurde (Tabelle 19). Auch bei

den Patienten mit Sarcoidose und M. Crohn war nur in wenigen Fällen eine deutliche SIF-Aktivität feststellbar. Dagegen hemmten 19 Seren (44 %) der Patienten mit Kollagenosen stark die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation.

Diese Befunde zeigen, daß der Nachweis der SIF-Aktivität nicht für die Hepatitis spezifisch ist, sondern auch bei anderen Krankheiten, insbesondere Erkrankungen mit autoimmunen Prozessen, positiv sein kann. Gewebsschädigungen, wie sie beim Herzinfarkt vorkommen, scheinen dagegen zu keiner hemmenden Serumaktivität zu führen.

Insgesamt lassen die klinischen Untersuchungen eine gute Übereinstimmung zwischen SIF-Aktivität und dem Verlauf einer Hepatitis erkennen. Besonders bei Patienten mit juveniler lupoider Hepatitis scheint ein fehlender SIF-Nachweis eine Remission anzuzeigen. Ferner hat der SIF-Nachweis möglicherweise auch Bedeutung für die Steuerung der immunsuppressiven Therapie. Bei der HB_sAg-positiven chronischen Hepatitis kann durch die SIF-Bestimmung die Differentialdiagnose zwischen CPH und CAH erleichtert werden. Offen muß bleiben, ob die SIF-Bestimmung zur Differentialdiagnose einer alkohol-toxischen und virusbedingten Leberzirrhose herangezogen werden kann; eine Fragestellung, die insofern von Wichtigkeit ist, als häufig neben einer alkohol-toxischen Schädigung gleichzeitig auch eine virusbedingte vorliegt.

D DISKUSSION

I Nachweis von Seruminhibitionsfaktoren bei Patienten mit Hepatitis

Seren von Patienten mit Infektionen, Autoimmun- und Tumorerkrankungen können die Mitogen- oder Antigen-induzierte Proliferation von Patienten- und Kontrolllymphozyten unterdrücken (Tabelle 21; Nelson + Gatti, 1976). Obwohl die meisten Autoren diesen Effekt auf suppressive Faktoren im Serum zurückführten, wurden nur in wenigen Fällen Untersuchungen hinsichtlich des Mechanismus der erniedrigten ^{3}H-Thymidineinbauraten durchgeführt. Unklar blieb in vielen Fällen, ob das Patientenserum die Lymphozytenstimulation aktiv hemmte oder ob der Effekt durch Mangel an Nährstoffen im Patientenserum oder Bindung von Mitogen an Proteine des Patientenserums verursacht wurde.
Diese Einwände gelten auch für die meisten Untersuchungen, in denen eine hemmende Serumaktivität bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis beschrieben wurden.

Mella + Lang (1967) stellten erstmals fest, daß Seren von 9 der 12 untersuchten Patienten mit akuter infektiöser Hepatitis die Mitoserate normaler Lymphozyten unterdrückten. Weitere Untersuchungen ergaben, daß die Anzahl der Mitosen nach PHA-Stimulation durch Seren von 19 Patienten zwei Wochen vor bis zwei Wochen nach Ausbruch der akuten Hepatitis A erniedrigt war, während zu einem späteren Zeitpunkt keine hemmende Aktivität mehr festzustellen war (Mella, 1969). Diese Befunde stimmen mit dem Nachweis der SIF-Aktivität in der Inkubationsphase der akuten Virushepatitis überein. Darüber hinaus konnte Mella zeigen, daß Seren von 15 der 21 getesteten Patienten 1 - 48 Monate nach Bluttransfusionen die Lymphozytenstimulation hemmten.

Willems et al. (1969) fanden ebenfalls eine hemmende Aktivität in Seren von 10 Patienten mit akuter Virushepatitis, wobei sie schwächere Hemmungen allerdings auch in Normalseren beobachteten. Bei diesen Untersuchungen wurde den Lymphozytenkulturen 10 % Patientenserum oder Normalserum zugesetzt. Das Kulturmedium enthielt im Unterschied zu den von Baroyan et al. (1970) beschriebenen Testbedingungen kein zusätzliches Normalserum. Baroyan et al. schlossen dadurch einen

abelle 21 Hemmung der Lymphozytenproliferation durch Seren bei menschlichen Erkrankungen (1)

Erkrankung	Lymphozytenspender Patient	Normal-person	Mitogen, Antigen; MLR	Bemerkungen	Referenz
) Infektionen					
epra	+	+	PHA, PPD, MLR	Serumfaktor nicht dialysierbar; Hautanergie	Bullock + Fasal, 1971 Nelson et al., 1975 Bjune + Barnetson, 1976
uberkulose	+	-	PHA, PPD		Heilman + Mc Farland, 1966
ubakut sklerosierende anencephalitis	+	+	PHA, MLR	Hemmung der Rosetten-bildung; Hautanergie	Swick et al., 1976
Viederholte Infektionen bei indern	+	+	PHA, MLR		Fitzgerald + Hosking, 1976
yphilis	+	+	PHA		Levene et al., 1969
istoplasmose	+	-	Ag		Newberry et al., 1968
andidiasis	+	+	MLR, Candida Monilia	keine Hemmung der PHA-Stimulation; Hautanergie	Canales et al., 1969 Paterson et al., 1971 Twomey et al., 1975
Malaria	+	+	PHA	Vollblutkultur und isolierte Lymphozyten	Moore et al., 1977

abelle 21 Hemmung der Lymphozytenproliferation durch Seren bei menschlichen Erkrankungen (2)

Erkrankung	Lymphozytenspender Patient	Normal-person	Mitogen, Antigen; MLR	Bemerkungen		Referenz
) Autoimmunerkrankungen u.a.						
upus erythematodes	+	+	PHA, ConA, PWM, MLR		Hautanergie	Horwitz + Cousar, 1975 Horwitz et al., 1977 Suciu-Foca et al., 1974 Malavé et al., 1975 Wernet + Kunkel, 1973
rimär-biliäre Zirrhose	+	+	PHA, PPD		Hautanergie	Mac Sween + Thomas, 1973 Fox et al., 1973
arcoidose	+	+	PHA, Candida		Hautanergie	Mangi et al., 1974 Belcher et al., 1974
taxia teleangiectatika	+	+	PHA, PWM	α -Globulinerhöhung;	Hautanergie	Mc Farlin + Oppenheim, 1969
lephrotisches Syndrom	+	+	PHA, MLR			Moorthy et al., 1976
lierenversagen	+	+	PHA, PPD, MLR	aktive Hemmung, Effekt reversibel, hemmende Aktivität im Albuminpeak (G-200);	Hautanergie	Newberry + Sanford, 1971 Touraine et al., 1975 Nelson + Penrose, 1975
) Tumorerkrankungen						
eukämie	-	+	PHA, PWM			Humphrey et al., 1975
Morbus Hodgkin	-	+	PHA			Trubowitz et al., 1966 Pappas et al., 1977
arcom, Melanom	-	+	PHA, MLR, Ag			Suciu-Foca et al., 1973

Nährstoffmangel weitgehend aus. Ferner fanden die Autoren in Übereinstimmung mit den eigenen Untersuchungen, daß die Hemmung der Lymphozytenstimulation unabhängig von der Dauer der Kultur (2 - 4 Tage) nachweisbar ist. Eine erniedrigte Stimulation normaler Lymphozyten in Gegenwart der Seren von 16 Patienten während der ersten 10 Tage der akuten Virushepatitis A wurde ferner von Pappas et al. (1970) beschrieben.

Newble et al. (1975) führten erstmals Verlaufsuntersuchungen der PHA-induzierten Stimulierbarkeit bei insgesamt 21 Patienten mit akuter Virushepatitis durch. Eine erniedrigte Stimulation fanden die Autoren in Gegenwart des autologen Serums (Vollblutkulturen) vor allem in der ersten Woche nach Einsetzen des Ikterus. Sowohl autologe als auch homologe, gewaschene Lymphozyten wurden durch Seren von 13 Patienten in der ersten Woche der akuten Phase gehemmt.

Newberry et al. (1973) fanden, daß auch Seren von Patienten mit chronischen Leberkrankheiten die Mitogenstimulation normaler Lymphozyten unterdrücken, wobei Seren von HB_sAg-Trägern nur schwach hemmende Aktivität aufwiesen. Ähnlich wie Newberry et al. beschrieben Hsu + Leevy (1971) eine Hemmung durch Seren von Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose, fanden dagegen im Unterschied zu Newberry et al. keine Aktivität in Seren von Patienten mit Verschlußikterus.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen zeigten Newberry et al., daß die Patientenseren nicht zytotoxisch gegen die Lymphozyten in der Kultur reagierten. An drei Patientenseren wiesen sie ferner eine aktive Hemmung der Lymphozytenproliferation nach, da die Lymphozyten in den Kulturansätzen, die 10 % Normalserum und 10 % Patientenserum enthielten, nach der PHA-Stimulation weniger ^3H-Thymidin aufnahmen als in Ansätzen mit 10 %-igem Normalserum. Nach Newberry et al. wurde die Hemmung nicht durch Gallensäuren, Bilirubin, Transaminasen oder durch erhöhte alkalische Phosphatasewerte hervorgerufen.

Einige Seren von Patienten mit Hepatitis wurden von Nakao et al. (1975) auf hemmende Aktivität getestet. Eine Suppression fanden sie bei Patienten mit akuter Virushepatitis, CAH und Leberzirrhose sowie bei einem Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis. Auch Tremolada et al. (1977) beschrieben hem-

mende Serumfaktoren bei 13 Patienten während der akuten Phase der Virushepatitis, bei 15 Patienten mit aktiver CAH sowie 13 HB_sAg-Trägern. Die bisher aufgeführten Befunde sprechen allerdings dafür, daß Seren von gesunden HB_sAg-Trägern nicht hemmen.

In Übereinstimmung damit fanden Geubel et al. (1976) keine Inhibition der Lymphozytenstimulation durch Seren von 5 Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis im Gegensatz zu 8 von 25 Patienten mit CAH und 2 Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose. Interessant war, daß die Lymphozyten von 5 Patienten, deren Seren eine hemmende Aktivität aufwiesen, eine erniedrigte spontane Zytotoxizität gegenüber autologen Leberzellen zeigten im Vergleich zu Lymphozyten von 8 Patienten, deren Seren nicht hemmten.

Wands et al. (1975 a) fanden, daß Seren von Patienten in den ersten zwei Wochen der akuten Virushepatitis sowie Seren von Patienten mit CAH die ConA induzierte Lymphozytenproliferation unterdrückten. In diesen Untersuchungen enthielten die Kulturansätze 10 % fötales Kälberserum, was einer Verdünnung von 1 :4 im SIF-Test entspricht. Ferner wurde die spontane und ConA-induzierte Lymphozytotoxizität gegenüber Chang-Leberzellen bei drei Patienten mit akuter Virushepatitis und drei Patienten mit CAH durch Zusatz von autologem Serum erniedrigt. Die Hemmung war auch mit normalen, stimulierten Lymphozyten nachweisbar. Die Ergebnisse von Wands et al. sprachen dafür, daß bei den Patienten mit Hepatitis kein Defekt der Lymphozytenreaktivität (intrinsic defect) vorliegt, wie auch aus den vorliegenden Befunden zu schließen ist. Im Unterschied zu Geubel et al. fand sich in diesen Untersuchungen bei zwei Patienten mit CAH, bei denen hemmende Serumfaktoren nachgewiesen wurden, eine erhöhte spontane Lymphozytotoxizität. Auch eine Hemmung der spontanen Lymphozytotoxizität gegenüber autologen Leberzellen durch autologes Serum konnten Paronetto + Vernace (1975) bei zwei Patienten mit CAH beobachten.

Diese Ergebnisse stimmen im wesentlichen mit den eigenen Befunden überein, in denen zum ersten Mal Verlaufsuntersuchungen über einen Zeitraum von 1 - 4 Jahren durchgeführt wurden.

Chisari + Edgington (1975) beschrieben darüber hinaus einen weiteren suppressiven Faktor, der die Rosettenbildung von Lymphozyten hemmt (Rosetteninhibitionsfaktor, RIF). Untersuchungen an Patienten mit verschiedenen Erkrankungen ergaben (Chisari et al., 1976, 1977), daß in den ersten 4 Wochen der akuten Virushepatitis Seren von 16 der 30 untersuchten Patienten die Rosettenbildung der Lymphozyten mit Schafserythrozyten hemmten (extrinsic defect). Bei 8 weiteren Fällen bildeten die Lymphozyten der Patienten auch in Abwesenheit des autologen Serums weniger E-Rosetten (intrinsic defect).

Während 9 untersuchte Patienten nach der Ausheilung der akuten Virushepatitis RIF-negativ waren, hemmten Seren von 10 Patienten mit fortschreitender Leberentzündung 12 - 16 Wochen nach Beginn der Virushepatitis die Rosettenbildung. Ähnlich waren Seren von 7 der 8 untersuchten Patienten mit CAH RIF-positiv. Demnach scheint der Nachweis von RIF für eine fortbestehende Leberentzündung zu sprechen, während dem Nachweis eines "intrinsic"-Rosettenbildungsdefektes der Lymphozyten keine prognostische Bedeutung zukommt.
Während Chisari et al. (1977) RIF nur bei der Virushepatitis A und B nachweisen konnten, geht aus den Untersuchungen von Wieczorek et al. (1977) hervor, daß Rosetteninhibitionsfaktoren auch bei Patienten mit Tuberkulose und nach Maisch et al. (1978) bei Patienten mit Herzkrankheit (Postkardiotomiesyndrom) vorkommen können.

Vergleicht man die Testbedingungen, mit denen hemmende Serumfaktoren nachgewiesen wurden, so sind erhebliche methodische Variationen festzustellen. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde daher versucht, den Nachweis von Seruminhibitionsfaktoren folgendermaßen zu verbessern und zu standardisieren:

a) Im Test wurden jeweils Lymphozyten von 2 bis 3 gut stimulierbaren, gesunden Spendern verwendet.
b) Die Stimulation erfolgte mit einer optimalen Mitogendosis.
c) Dem Kulturmedium wurde als Nährstoffquelle 10 % Normalserum zugesetzt.
d) Als Kontrollseren wurden ein Normalserum -Pool sowie zwei weitere Normalseren verwendet, da in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß

die Mitogen-induzierte Lymphozytenstimulation in Gegenwart verschiedener Normalseren variieren kann und Normalseren hemmende Aktivität haben können (Knoke et al., 1974; Hinz + Chickosky, 1972; Mc Intyre + Cole, 1969; Nelson + Gatti, 1976).

e) Als untere Norm wurde ein Inhibitionsindex von 0.7 festgesetzt, der noch unter dem Wert von 0.85 liegt, den Knoke et al. in ihren detaillierten Untersuchungen über den Einfluß von Normalseren auf die Mitogenstimulation normaler Lymphozyten angaben.

Unter diesen Testbedingungen ließen sich die SIF- Indizes von Seren unterschiedlicher SIF-Aktivität unter Verwendung verschiedener Mitogene reproduzieren, so daß in Übereinstimmung mit Knoke et al. sowie Hinz et al. angenommen werden kann, daß mit Hilfe der Lymphozytenkultur eine Hierarchie von Serumeffekten aufgestellt werden kann.

Bei dem Nachweissystem war der Einwand zu entkräften, daß die erniedrigte Lymphozytenproliferation Folge einer Bindung von Mitogen an Proteine des Patientenserums war. So wurde in zahlreichen Untersuchungen darauf hingewiesen, daß vor allem Makroglobuline die Mitogene Phytohämagglutinin und Concanavalin A binden können (Morse, 1968; Goldstein et al., 1969; Havemann et al., 1970). Zahlreiche Befunde sprechen jedoch dagegen, daß die Hemmung SIF-positiver Seren durch eine erniedrigte Mitogenkonzentration in der Kultur verursacht wird:

a) In 15 SIF^+ Seren war die α_2-Makroglobulinkonzentration nicht erhöht und es bestand keine Korrelation mit der SIF-Aktivität.

b) Die Hemmung wurde nur unwesentlich von der verwendeten Mitogenkonzentration verändert. Eine Erhöhung der Konzentration von 10 auf 100 µg PHA/ml (10-fach) führte zu keiner Aufhebung der Inhibition. Bei Verwendung verschiedener Mitogene nahm die Hemmung nach Überschreiten der optimalen Mitogendosis sogar wieder zu. In einigen Fällen, wie z.B. beim Test mit Limalektin, wurde nicht mit supraoptimalen Mitogenkonzentrationen stimuliert.

Ferner fiel bei den Dosiswirkungskurven auf, daß mit Patientenserum in 36 % der Kurven der maximale ^{3}H-Thymidineinbau im Vergleich zur Reaktion mit Normalserum nach rechts verschoben war. Dieser Befund traf vor allem bei Stimulation mit PHA und Con A zu und könnte durch eine zusätzliche Bindung einer bestimmten Menge Mitogen verursacht worden sein.

c) Gegen die unspezifische Bindung spricht ferner die Tatsache, daß eine Hemmung unabhängig von dem verwendeten Mitogen nachweisbar war. Ferner wurde die gemischte Lymphozytenreaktion sowie die spontane Lymphozytenproliferation, bei denen keine Bindung von Mitogen oder Antigen stattfinden kann, durch SIF-positive Seren gehemmt.

d) In ähnlicher Weise konnte dies auch bei den kinetischen Untersuchungen abgeleitet werden, bei denen eine Hemmung auch dann eintrat, wenn die Lymphozyten mit SIF-positiven Seren ohne Mitogen inkubiert und erst nach Entfernen der Seren mit PHA stimuliert wurden. Hierbei waren Serum und Mitogen nicht gleichzeitig mit den Lymphozyten in Kontakt.

Eine Hemmung der ^{3}H-Thymidinaufnahme stimulierter Lymphozyten kann auch durch Verdünnung des radioaktiven Thymidins aufgrund erhöhter Thymidinkonzentrationen im Patientenserum vorgetäuscht werden, worauf Opitz et al. (1975) und Kasahara + Shioiri-Nakano (1976) in anderem Zusammenhang hinwiesen. Für die SIF-Hemmung konnte dieser Faktor ausgeschlossen werden.

a) So war der Nachweis der hemmenden SIF-Aktivität von dem Zeitpunkt der Serumzugabe abhängig.

b) Die Patientenseren hatten keinen SIF-spezifischen Einfluß auf Ehrlich Aszites Tumorzellen.

c) Eine Hemmung war auch im Testsystem nachweisbar, bei dem radioaktives Thymidin nicht verwendet wurde (Leukozytenmigrationshemmtest, E-Rosettentest).

d) Schließlich sprechen physikalische Eigenschaften von SIF, wie die fehlende Dialysierbarkeit und Isolierung im Albuminpeak, gegen einen Thymidinverdünnungseffekt.

Für eine Interaktion zwischen Seruminhibitionsfaktoren und Lymphozyten sprach vor allem die Beobachtung, daß Lymphozyten, die 20 Stunden mit SIF-positivem

Serum vorinkubiert wurden, nur dann wieder stimulierbar waren, wenn sie vor Beginn der Mitogenstimulation 3-mal gewaschen wurden. Es ist daher anzunehmen, daß die Präsenz der Faktoren an der Lymphozytenmembran für die hemmende Wirkung eine wichtige Voraussetzung ist.

II Immunsuppressive Eigenschaften von SIF

In den letzten Jahren berichteten viele Arbeitsgruppen von Faktoren, die Lymphozyten inhibieren oder stimulieren und die im Serum oder in Kulturüberständen nachweisbar sind (Nelson + Gatti, 1976). Um zu untersuchen, ob SIF zu diesen suppressiven Faktoren zu zählen ist, wurde der Einfluß SIF-positiver Seren auf verschiedene Lymphozytenreaktionen bestimmt.
Auf der 11. Leukozytenkonferenz in Tuscon, Arizona, im September 1976 wurden Kriterien aufgestellt, die für immunsuppressive Substanzen charakteristisch sind (Jakobs + Janicki, 1977). In Anlehnung daran werden im folgenden die SIF-Eigenschaften diskutiert.

1. Ausschluß von Zytotoxizität und Nachweis von Reversibilität der Hemmung
Dieses Kriterium trifft für Serumhemmfaktoren zu:
a) Die Vitalität der Lymphozyten wurde durch SIF nicht beeinträchtigt.
b) In 15 SIF-positiven Seren waren keine lymphozytotoxischen Antikörper nachweisbar.
c) Stark hemmende Seren hatten keinen oder nur einen geringen Effekt, wenn sie später als 12 Stunden nach Beginn der Lymphozytenaktivierung zugesetzt wurden.
d) Der ^{3}H-Thymidineinbau von Ehrlich Aszites Tumorzellen lag in Gegenwart stark hemmender Seren von Patienten mit akuter Virushepatitis 20 - 50 % über dem der Kontrolle.

Für eine Reversibilität der Inhibition sprach:
a) Lymphozyten, die 20 Stunden mit stark hemmendem Serum inkubiert wurden, waren nach dem Waschen nahezu normal stimulierbar, während sie nach Abpipettieren des Serums kaum reagierten.
b) Bei SIF-positiven Patienten war die Lymphozytenproliferation in der Vollblutkultur unterdrückt, während die isolierten, gewaschenen Lymphozyten ähnlich wie die Kontrollymphozyten ^{3}H-Thymidin einbauten.

2. Zellspezifische Wirkung

Zu diesem Kriterium liegen nur vorläufige Ergebnisse vor. SIF-positive Seren hemmten zwar die Mitogen-induzierte Proliferation autologer, homologer sowie heterologer Lymphozyten, nicht aber die Proliferation von Ehrlich Aszites Tumorzellen. Auffallend war, daß Seren von Patienten mit akuter Virushepatitis im Gegensatz zu den Seren der Patienten mit CAH unabhängig von der SIF-Aktivität eher eine stimulierende Wirkung auf Ascites Tumorzellen hatten (mittlerer Index von 7 Seren = 1.5 ± 0.15).

3. Hemmung der Lymphozytenstimulation durch verschiedene Mitogene unabhängig von der Konzentration und Kulturdauer

Auch diese Forderung trifft für SIF zu, wobei als T-Mitogene PHA, ConA und Limabohnenlektin, als B-Mitogen Staphylokokkenprotein A und als T + B-Mitogen PWM verwandt wurden. Die Hemmung war in Abhängigkeit zur SIF-Aktivität der Standardseren unabhängig von der Mitogenkonzentration bzw. der Inkubationsdauer relativ konstant nachweisbar. Der SIF-Effekt war bei schwächer stimulierenden Mitogenen (PWM, Staphylokokkenprotein A) deutlicher und einheitlicher ausgeprägt als bei den stärker stimulierenden Mitogenen PHA, ConA und Lima.
Aus den Untersuchungen geht jedoch nicht eindeutig hervor, ob SIF auch die Stimulation von B-Lymphozyten unterdrückt. Aus den Ergebnissen von Forsgren et al. (1976 a, b) ist ersichtlich, daß Staphylokokkenprotein A spezifisch menschliche B-Lymphozyten stimuliert. Möller + Landwall (1977) konnten ferner zeigen, daß dieser Effekt auch in Gegenwart von Serum (50 %) zustande kommt. Dagegen werden nach neueren Untersuchungen von Sakane + Green (1978) durch Staphylokokkenprotein A auch T-Lymphozyten aktiviert. Da bis heute die Isolierung von T- und B-Lymphozyten nicht möglich ist und darüber hinaus während einer B-Lymphozytenstimulation T-Zellen sekundär mitaktiviert werden können (Weksler + Kuntz, 1976), ist die Frage mit den augenblicklichen methodischen Möglichkeiten nicht zu klären.

Auch beim Test mit Mäuselymphozyten war der Einfluß SIF-positiver Seren auf die Stimulation mit LPS nicht eindeutig, da sich die Aktivitätsgrade nicht reproduzieren ließen.
Eine weitere Möglichkeit, den Einfluß von SIF auf B-Lymphozyten zu prüfen, besteht darin, die Wirkung von SIF auf die Antikörpersynthese zu untersuchen.

4. Unterdrückung zellvermittelter Immunreaktionen

Ähnlich stark wie die Mitogenstimulation hemmten SIF-positive Seren auch die Antigen (PPD) und Alloantigen (MLR) induzierte Lymphozytenproliferation je nach SIF-Aktivität, so daß daraus geschlossen werden kann, daß SIF die Proliferation der Lymphozyten unabhängig von der Art des Stimulators supprimieren können.

Weiterhin wurde der SIF-Einfluß auf die PPD-induzierte Leukozytenmigrationshemmung untersucht. Stark hemmende Seren bewirkten eine deutliche Reduktion der Wanderungshemmung, eine vollständige Aufhebung konnte allerdings nicht erreicht werden.

Auf welche Weise diese Hemmung zustande kam blieb ungeklärt. Möglich ist, daß SIF die Bildung des migrationshemmenden Lymphokins verhindern oder die Wirkung des Mediators auf die wanderenden Zellen blockieren. So konnten Mortensen et al. (1977) in einem indirekten Migrationshemmtest nachweisen, daß C-reaktives Protein die Bildung des Lymphokins unterdrückte. Sie schlossen daraus, daß C-reaktives Protein eine Phase der Lymphozytenaktivierung vor der DNS-Synthese beeinträchtigte, denn die Lymphokinproduktion findet bereits 6 - 8 Stunden nach Beginn der Stimulation statt und ist, wie auch die Interferonbildung, nicht mit der Lymphozytenproliferation assoziiert (Bloom et al., 1972; Rocklin, 1973).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Einfluß SIF-positiver Seren auf zytotoxische Lymphozytenreaktionen noch nicht untersucht. Wands et al. (1975 a) konnten allerdings zeigen, daß Seren von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis zytotoxische Reaktionen gegenüber Chang-Leberzellen hemmen können. Ähnliche Befunde ergaben sich aus den Untersuchungen von Geubel et al. (1976), in denen Lymphozyten von Patienten mit hemmender Serumaktivität nur geringe zytotoxische Aktivität im Vergleich zu Lymphozyten von Patienten ohne hemmende Serumfaktoren zeigten.

5. Unterdrückung der induktiven bzw. Effektorphase der Immunantwort

Die Untersuchungen über die Beeinflußbarkeit der PHA-induzierten Lymphozytenproliferation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe oder Entfernung SIF-positiver Seren sprechen dafür, daß SIF vor allem auf die Frühphase der Reaktion zwischen Lymphozyt und Mitogen einwirken. Damit es zum Nachweis der Hemmung

kommt, müssen SIF-positive Seren vor Beginn der Lymphozytenaktivierung oder während der ersten 12 - 18 Stunden der Stimulation auf die Lymphozyten wirken. Je später die Seren im Ablauf der Stimulation zugesetzt werden, um so geringer ist die Hemmung.

Lucas + Klimpel (1977) unterschieden drei Phasen bei der Lymphozytenaktivierung: die frühe Phase beschränkt sich auf die Zeit unmittelbar nach Zusatz des Aktivators und ist gekennzeichnet durch eine Aktivierung des Phospholipidstoffwechsels, der Ionenpumpen und der zyklischen AMP-abhängigen Proteinkinase, Reaktionen also, die den Membranstoffwechsel wiederspiegeln. Die intermediäre Phase spielt sich in der 3. - 20. Stunde ab, in der vor allem die Protein- und RNS-Synthese stattfindet und Lymphokine wie z. B. der Migrationsinhibitionsfaktor, Interferon und Lymphotoxin gebildet werden. Die späte Phase erstreckt sich über einen Zeitraum vom 2. - 5. Tag der Stimulation und ist gekennzeichnet durch die DNS-Synthese mit nachfolgender Mitose.

Die frühe Phase der Lymphozytenaktivierung scheint nicht durch SIF beeinträchtigt zu werden, da einerseits keine Hemmung nachweisbar war, wenn SIF-positive Seren drei Stunden nach Stimulationsbeginn entfernt wurden; andererseits kam es zu einer deutlichen Hemmung, wenn die Seren drei Stunden nach Beginn der Lymphozytenaktivierung zugesetzt wurden. Wurden SIF-positive Seren 18 Stunden nach Beginn der Stimulation zupipettiert, konnte keine Hemmung mehr erzielt werden, während die Lymphozyten nach Entfernen der zu Beginn zugesetzten Seren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr stimulierbar waren.

Danach wirken die suppressiven Faktoren auf die intermediäre Phase der Lymphozytenstimulation. Dafür spricht auch, daß der hemmende Einfluß um so geringer war, je länger die Lymphozyten in dieser Phase aktiviert waren. Auch die Ergebnisse der Aufhebung der Leukozytenmigrationshemmung stimmen damit überein, da die migrationshemmenden Lymphokine während der 8. - 20. Stunde nach Antigenzusatz am stärksten gebildet werden.

Nach Ranney (1977) werden Faktoren, die Aktivierungsprozesse vor der DNS-Synthese und Zellteilung hemmen, als Antiaktivatoren bezeichnet und er rechnet das Interferon, das immunregulative α-Globulin (IRA) und das C-reaktive Protein (CRP) dazu. Möglicherweise gehören auch SIF zu diesen Faktoren.

Es sind auch Faktoren beschrieben, von denen angenommen werden kann, daß sie die frühe Aktivierungsphase beeinflussen. So ist z.B. eine Hemmung der Lymphozytenstimulation durch das "very low density lipoprotein" (VLDL), das den Sterinstoffwechsel beeinträchtigt, bereits eine Stunde nach Beginn der Stimulation ausgeprägt (Chisari, 1977).
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die SIF-Eigenschaften weitgehend mit den für immunsuppressive Faktoren aufgestellten Kriterien übereinstimmen.

III Vergleich von SIF mit anderen suppressiven Faktoren

Aus den bisherigen Untersuchungen über die physikalischen Eigenschaften von SIF darf angenommen werden, daß es sich um Substanzen mit einem Molekulargewicht zwischen 50 - 120 000 Dalton handelt. So ließ sich die Hemmung weder durch Dialyse noch durch Filtration (Molekularfilter der Trenngrenze 50 000) aufheben und war nach gelchromatographischer Auftrennung SIF-positiver Seren im Albuminpeak mit gleicher Aktivität wie im Ausgangsserum nachweisbar.
Bei diesen Versuchen hemmten die Makroglobulin-Fraktionen unabhängig davon, ob SIF-positive oder SIF-negative Seren aufgetrennt worden waren. Auf eine Hemmung durch aus dem Serum isolierte Proteine sowie durch entstehende Mikroaggregate wurde von verschiedenen Autoren hingewiesen (Johannsen et al., 1976; Nelson + Gatti, 1976).

Es stellte sich zunächst die Frage, inwieweit Proteine, die im Albuminpeak eluiert wurden, für die Hemmung im SIF-Test verantwortlich waren, wobei jedoch in der Immunelektrophorese keine Unterschiede zwischen den Präzipitationsbanden der aus SIF-positiven oder SIF-negativen Seren eluierten Fraktionen erkennbar waren.

In diesem Zusammenhang ist vor allem das α_1-saure Glykoprotein zu nennen, das die PHA-, ConA-, PWM- und Alloantigen-induzierte Lymphozytenproliferation hemmen kann (Chiu et al., 1977). Allerdings ist die Hemmung durch hohe PHA-Konzentrationen aufhebbar und es wird die ConA-, PWM-Stimulation sowie die gemischte Lymphozytenreaktion durch das Protein nur geringgradig beeinflußt. Ferner ist das α_1-saure Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 41 000

Dalton im Gegensatz zu SIF durch ein Molekularfilter der Trenngrenze 50 000 Dalton filtrierbar (siehe Tabelle 22: 1).
Von den anderen im Albuminpeak eluierten Proteinen sind suppressive Effekte nur von Präalbumin und Albumin bekannt, die jedoch erst in höheren Konzentrationen nachweisbar sind (Johannsen et al., 1976; Littman et al., 1977).

Weiterhin kommen Faktoren in Frage, die während einer Hepatitis freigesetzt werden und die Lymphozyten in ihrer Reaktion beeinflussen können, wie Bilirubin, Lymphozytotoxine und Immunkomplexe. Eine Korrelation zur SIF-Aktivität konnte allerdings nicht festgestellt werden.
Die Hemmung der Lymphozytenstimulation wurde nicht durch Bilirubin verursacht. Newberry et al. (1973) konnten keine Hemmung und Rola-Pleszczynski et al. (1975) nur eine leichte Hemmung durch Bilirubin hervorrufen, die in hohen PHA-Konzentrationen aufhebbar war.

Auch eine Hemmung durch Lymphozytotoxine (siehe Tabelle 22: 2) erscheint unwahrscheinlich. Diese kommen zwar in der frühen Phase der akuten Virushepatitis und auch bei Patienten mit CAH vor (Bertrams et al., 1976; De Horatius et al., 1976), in den eigenen Untersuchungen waren jedoch zytotoxische Effekte SIF-positiver Seren nicht zu beobachten (Mikrozytotoxizitätstest; mikroskopische Auswertung). Auch hemmten die IgG-Fraktionen SIF-positiver Seren nicht die Lymphozytenstimulation.

Bei der akuten und chronischen Hepatitis treten ferner Immunkomplexe auf (Wands et al., 1975 c; Thomas et al., 1977), von denen bekannt ist, daß sie die Reaktivität von Lymphozyten beeinflussen können (Gorczynski et al., 1974). Ein Vergleich von SIF-Aktivität und Immunkomplexbestimmung ergab keinen Hinweis auf eine Übereinstimmung.

Eine Hemmung durch Cortison bei immunsuppressiv behandelten Patienten ist ebenfalls nicht anzunehmen, da nach den pharmakokinetischen Untersuchungen von Schalm und Summerskill (1977) die Cortisonkonzentrationen im Serum sehr schnell abfallen, so daß eine suppressive Dosis von 1 - 10 µg/ml (Heilman et al., 1973) in der Kultur kaum erreicht werden kann. Ferner standen die meisten hier untersuchten Patienten nicht unter immunsuppressiver Therapie.

Bei chronischen Lebererkrankungen, insbesondere bei Leberzirrhose und Leberversagen, können Fibrinspaltprodukte verstärkt auftreten (Nossel et al., 1974; Ohler, 1977). Verschiedene Autoren wiesen darauf hin, daß diese Spaltprodukte (siehe Tabelle 22: 3) die PHA, PPD und Alloantigen-induzierte Lymphozytenproliferation sowie auch die in vivo Antikörpersynthese unterdrücken können (Girman et al., 1976; Gramse et al., 1977; Edgington + Plow, 1976). Ferner wirken diese Faktoren wie SIF auf die frühe Phase der Lymphozytenaktivierung. Eindeutige Unterschiede bestehen jedoch in den physikalischen Eigenschaften: Die Spaltprodukte weisen ein Molekulargewicht von ca. 6 000 (500 - 15 000) Dalton auf, sind daher dialysierbar, werden bei Gelfiltration (G-200) in einem vierten Peak eluiert und sind thermostabil. Ferner hemmen diese Faktoren im Unterschied zu SIF die Leukozytenmigration (Gramse et al., 1977).

Schumacher et al. (1974) isolierten aus menschlicher Leber den Lymphozyteninhibierenden Faktor (siehe Tabelle 22: 4), der in Übereinstimmung mit SIF die spontane, Mitogen- (PHA, PPD) sowie Alloantigen-induzierte Lymphozytenproliferation unterdrückt, wobei er wahrscheinlich auf die RNS-Synthese wirkt. Die Proliferation von Hela-Zellen wird dagegen kaum beeinträchtigt. Der nach Gelfiltration (Sephadex G-100) ermittelte Molekulargewichtsbereich lag bei 65-80 000 Dalton. Das Protein wandert im β-γ-Globulinbereich. Im Unterschied zu SIF beeinträchtigt der Faktor die Leukozytenwanderung.

Dieses Protein kommt normalerweise nur in sehr geringer Konzentration im Serum vor. Es ist aber vorstellbar, daß es während einer Leberentzündung verstärkt aus der Leber freigesetzt wird. Über seine Funktion ist nichts bekannt; es könnte eine Rolle spielen bei der Aufrechterhaltung der Toleranz.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kommt der SIF-Effekt nicht durch Serumprodukte und Substanzen zustande, die während einer Hepatitis auftreten können, obwohl im Einzelfall ein Einfluß dieser Faktoren nicht ausgeschlossen werden kann.

Im folgenden sollen SIF mit den wichtigsten immunsuppressiven Serumfaktoren verglichen werden, die bisher beschrieben wurden (Übersicht in Tabelle 22).

Tabelle 22 Vergleich von SIF mit suppressiven Serumfaktoren (1)

Serumfaktor	Referenz	Übereinstimmung mit SIF	keine Übereinstimmung mit SIF	weitere Eigenschaften
1. α_1-saures Glykoprotein	Chiu et al., 1977	- Konzentration bei akuten Entzündungen erhöht (akute Phase - Protein) - Hemmung der Ly-Stimulation (PHA, ConA, PWM, MLR) - keine Zytotoxizität	- keine Hemmung der PHA-Stimulation in hohen PHA-Dosen - PWM-, ConA-Stimulation schwach gehemmt - MG 41 000 Dalton	
2. anti-Lymphozyten-antikörper	De Horatius et al., 1976 Bertrams et al., 1976	- Nachweis bei AVH und CAH - Fehlen nach Ausheilung	- keine Zytotoxizität durch SIF^+ Seren - SIF-Aktivität im Albuminpeak - anti-Ly-Ak sind schwer abwaschbar (Hirata + Terasaki, 1972) - anti-Ly-Ak hemmen nach 24 Std. Ly-Stimulation	
3. Fibrin-spalt-produkte	Girmann et al., 1976 Edgington + Plow, 1976 Gramse et al., 1977	- Nachweis bei Leberzirrhose - Hemmung der Ly-Stimulation (PHA, PPD, MLR) - Effekt auf die frühe Phase der Ly-Aktivierung - keine Zytotoxizität	- kein Nachweis bei AVH - Hemmung der Leukozytenmigration - Hemmung noch nach 70 Std. Ly-Stimulation - MG 500-15000 Dalton; dialysierbar, thermostabil	- in vivo Suppression der Ak-Synthese
4. Lymphozyten-inhibierender Faktor	Schumacher et al., 1974	- Hemmung der Ly-Stimulation (PHA, PPD, MLR) - Hemmung der spontanen Ly-Proliferation - MG 65-80000 Dalton (G- 100) - keine Spezies-Spezifität	- Hemmung der Leukozytenmigration	- Isolation aus Human-leber - Nachweis im NS in geringer Konzentration - β-γ-Mobilität

Tabelle 22 Vergleich von SIF mit suppressiven Serumfaktoren (2)

Serumfaktor	Referenz	Übereinstimmung mit SIF	keine Übereinstimmung mit SIF	weitere Eigenschaften
5. Serum-Inhibitor der zellvermittelten Immunantwort	Wands et al., 1975 a, b	- Nachweis bei AVH und CAH Fehlen nach Ausheilung - Hemmung der ConA-Stimulation	- MG 200 000 Dalton (G-200)	- Hemmung der spont. u. ConA induzierten Ly-Zytotoxizität (Chang-Leberzellen)
6. α-Fetoprotein (AFP)	Murgita + Tomasi, 1975 a, b Yachnin, 1976 Littman et al., 1977	- erhöhte Konzentration bei AVH und CAH Fehlen nach Ausheilung - Hemmung der Ly-Stimulation (PHA, ConA, MLR, LPS), (Maus) - Effekt auf frühe Phase der Ly-Aktivierung - keine Zytotoxizität u. Spezies-Spezifität - MG 70 000 Dalton	- keine erhöhten AFP-Konzentrationen ($<100\ \mu g/ml$) in SIF^+ Seren u. keine Korrelation SIF - AFP - max. AFP-Erhöhung nach dem Transaminasengipfel - keine Reversibilität (Waschen) nach 8 Std. Inkubation mit Ly	- Suppression der CMI u. Ak-Synthese in vitro u. in vivo (Maus) - AFP-Rezeptoren auf Milzzellen (Maus) - AFP an Ly von CAH-Patienten
7. Rosetten-inhibitionsfaktor (RIF)	Chisari + Edgington, 1975 Chisari et al., 1976, 1977	- Nachweis bei AVH und CAH - Fehlen nach Ausheilung; Persistenz bei Progression - Hemmung der E-Rosettenbildung - keine Zytotoxizität - nicht dialysierbar; stabil bei 56° C	- Nachweis nur bei Hepatitis A und B - Nachweis mit Leberzellschaden assoziiert - schwache Hemmung der Ly-Stimulation (PHA, MLR) - MG 2.5×10^6 Dalton	- Bindung an T-Ly 3000 Rezeptoren/Ly - Low density Lipoprotein (Dichte 1.05 g/ml)
8. C-reaktives Protein	Mortensen et al., 1975, 1976, 1977	- Konzentration bei akuten Entzündungen erhöht (akute Phase - Protein) - Hemmung der Ly-Stimulation (PPD, MLR) - Aufhebung der Migrationshemmung - Effekt auf die frühe Phase der Ly-Aktivierung - keine Zytotoxizität - MG 120 000 Dalton	- keine Hemmung der PHA-, ConA-Stimulation	- Bindung an T-Ly - Hemmung der Bildung zytotoxischer Ly (Maus)

Tabelle 22 Vergleich von SIF mit suppressiven Serumfaktoren (3)

Serumfaktor	Referenz	Übereinstimmung mit SIF	keine Übereinstimmung mit SIF	weitere Eigenschaften
9. Interferon	Weinstein et al., 1977 Booth et al., 1976 Blomgren et al., 1974	- Hemmung der Ly-Stimulation (PHA, ConA, PWM, PPD, MLR), (Maus) - Effekt auf die frühe Phase der Ly-Aktivierung - keine Zytotoxizität	- kein Nachweis bei AVH und CAH - schwache Hemmung der Ly-Stimulation beim Menschen (PHA, ConA, PWM, MLR)	- Suppression der CMI u. Ak-Synthese in vivo u. in vitro (Maus) - Stimulation der Killeraktivität
10. Serum Amyloid A Protein (SAA)	Benson et al., 1975 Husby + Natvig, 1974	- erhöhte Konzentration bei chronischen Entzündungen (CAH) - MG 85/180000 Dalton im Serum (Komplexbildung)	- kein Nachweis bei AVH	- Hemmung der in vitro Ak-Synthese (Maus)
11. α-Globuline (IRA)	Cooperband et al., 1972, 1976 Wang et al., 1977	- Hemmung der Ly-Stimulation (PHA, PPD, MLR) - Aufhebung der Migrationshemmung - Effekt auf die frühe Phase der Ly-Aktivierung - Reversibilität (Waschen) der Hemmung - keine Zytotoxizität, keine Spezies-Spezifität	- keine Hemmung der PWM-, LPS-Stimulation - stärkere Hemmung der MLR (4 x) als bei Mitogenstimulation	- Suppression der CMI u. Ak-Synthese in vivo u. in vitro - Suppression durch Peptid (MG 500-5000)
	Riggio et al., 1969 Burger et al., 1973, 1974 Veit + Michael, 1972, 1973 Nelson, 1972 Nelson + Shneider, 1974	- Hemmung der Ly-Stimulation (PHA, ConA, LPS, MLR) - Effekt auf die frühe Phase der Ly-Aktivierung - Reversibilität (Waschen) der Hemmung - keine Zytotoxizität - keine Dialysierbarkeit - Titration bis 2.5 % Serum in der Kultur - Hemmung im Albuminpeak (G-200)		- Erhöhung der α-Glob. bei der Immunantwort - Assoziation mit Hautanergie

Seruminhibitor der zellvermittelten Immunantwort (Tabelle 22: 5)
Weitgehende Übereinstimmungen bestehen zwischen SIF und einem von Wands et al. (1975 a, b) beschriebenen Seruminhibitor, der ebenfalls in der frühen Phase der akuten Virushepatitis wie auch bei Patienten mit CAH auftritt und die ConA-induzierte Lymphozytenproliferation unterdrückt. Dieser Faktor supprimiert auch die spontane und ConA-induzierte Lymphozytotoxizität. Der Seruminhibitor scheint während der Induktionsphase der Lymphozytenaktivierung zu wirken, da er die Bildung der zytotoxischen Lymphozyten beeinträchtigt. Insgesamt ist es möglich, daß SIF und der Seruminhibitor identisch sind, obwohl nach gelchromatographischer Auftrennung ein Molekulargewichtsbereich von 200 000 Dalton ermittelt wurde. Ähnlich wurde das Serum Amyloid A Protein aus dem Serum als 85 000- (Rosenthal + Franklin, 1977) bzw. 180 000-Dalton-Komplex (Sipe et al., 1976) isoliert. Ebenso beschrieben Yachnin + Lester (1977) Monomere und Multimere vom α -Fetoprotein.

Alphafetoprotein (AFP) (Tabelle 22: 6)
Es war vorstellbar, daß die Hemmung durch Alphafetoprotein hervorgerufen wurde, das ebenfalls bei der akuten und chronischen Hepatitis erhöht nachweisbar ist. Im Unterschied zu SIF kommt es allerdings erst nach dem Transaminasengipfel zur maximalen Erhöhung der AFP-Konzentration (20 - 100 ng/ml), da AFP während der Regeneration der Leberzellen gebildet wird (Silver et al., 1974).
Keller et al. (1976) konnten zeigen, daß AFP an der Oberfläche der Lymphozyten von Patienten mit CAH nachweisbar ist (bei 11 von 28 Patienten). Ferner fanden sie eine erniedrigte PHA-Stimulierbarkeit der Patientenlymphozyten und durch anti-AFP absorbierbare suppressive Serumfaktoren. Nach Littman et al. (1977) ist es jedoch unwahrscheinlich, daß die AFP-Konzentration in Seren von Patienten mit Hepatitis so hoch ist, daß sie in der Lymphozytenkultur suppressive Effekte hervorrufen kann (10 - 100 µg/ml). In 31 SIF-positiven Seren betrugen die AFP-Konzentrationen nur in zwei Fällen zwischen 20 - 100 ng/ml, d.h. die Werte lagen drei Zehnerpotenzen niedriger als die suppressiv wirkende Dosis.

Über immunsuppressive Eigenschaften von AFP liegen widersprüchliche Ergebnisse vor, die z.T. mit der unterschiedlichen Präparation in Zusammenhang gebracht

werden (Tomasi, 1977; Goeken + Thompson, 1977). Im Mäusesystem konnten sowohl in vitro als auch in vivo zellvermittelte Immunreaktionen und die Antikörpersynthese durch AFP supprimiert werden (Murgita + Tomasi, 1975 a, b; Dattwyler + Tomasi, 1975; Keller + Tomasi, 1976).

Yachnin (1976) sowie Gupta + Good (1977) beschrieben eine Hemmung der PHA-induzierten Lymphozytenproliferation durch humanes AFP und Auer + Kress (1977) eine Unterdrückung der gemischten Lymphozytenreaktion. Von anderen Autoren konnten immunsuppressive Eigenschaften von humanem AFP nicht bestätigt werden (Littman et al.,1977; Goeken + Thompson, 1977; Charpentier et al., 1977; Wands et al., 1975 b).

C-reaktives Protein (Tabelle 22: 8)

Das bei Entzündungen auftretende C-reaktive Protein kann als suppressiver Faktor ausgeschlossen werden, da es die PHA- und ConA-induzierte Lymphozytenproliferation nicht hemmt (Mortensen et al., 1975, 1976).

Interferon (Tabelle 22: 9)

Suppressive Effekte sind ferner von dem Lymphokin Interferon bekannt. Während bei der Maus in vitro und in vivo sowohl zellvermittelte Immunreaktionen als auch die Antikörpersynthese durch Interferon unterdrückt werden konnte (Lindahl-Magnussen et al., 1972; Brodeur + Merigan, 1974; Booth et al., 1976; Weinstein et al., 1977), waren beim Menschen nur schwache Effekte auf die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation nachweisbar (Blomgren et al., 1974). Allerdings fand sich eine deutliche Hemmung bei der PPD-Stimulation.
Gegen eine Identität von SIF und Interferon spricht ferner, daß das Lymphokin nicht bei allen Infektionen gebildet wird und bei der Hepatitis nicht nachgewiesen werden konnte (Wheelock et al., 1968; Hill et al., 1971; Tolentino et al., 1975).

Serum Amyloid A Protein (SAA) (Tabelle 22: 10)

Bei einer Reihe von Infektionen und chronischen Entzündungen wie der CAH und alkoholischen Leberzirrhose sind erhöhte SAA-Konzentrationen beschrieben worden (Husby + Natvig, 1974). Bei der akuten Virushepatitis war dieses Protein dagegen nicht nachweisbar. Insofern kann im Einzelfall, insbesondere bei der

Leberzirrhose, SAA als suppressiver Faktor nicht ausgeschlossen werden. Bisher ist allerdings nur bekannt, daß dieses α-Globulin die in vitro Antikörpersynthese unterdrückt (Benson et al., 1975). Das Molekulargewicht von SAA liegt im Serum bei 85 000 Dalton (Rosenthal + Franklin, 1977) bzw. 180 000 Dalton (Sipe et al., 1976).

Rosetteninhibitionsfaktor (RIF) (Tabelle 22: 7)
Von den bisher aufgeführten suppressiven Faktoren unterscheidet sich der Rosetteninhibitionsfaktor (RIF) dadurch, daß er vor allem auf die T-Rosettenbildung von Lymphozyten und nur schwach auf die Stimulation von Lymphozyten wirkt. Der von Chisari + Edgington (1975) isolierte RIF tritt vorübergehend während der akuten Virushepatitis A und B auf und persistiert bei fortschreitender Leberentzündung. Im Unterschied zu SIF scheint RIF mit dem Leberzellschaden assoziiert zu sein.

Während RIF nur geringen Einfluß auf die PHA- und Alloantigen-induzierte Lymphozytenproliferation hatte, war die E-Rosettenbildung von Lymphozyten, die mit stark positiven SIF-Seren 20 Stunden vorinkubiert wurden, um 20 - 40 % reduziert. Diese im Vergleich zum SIF-Einfluß auf die Lymphozytenproliferation schwache Hemmung kann durch die angewandte Methode (Rosettenbildung nach Chisari + Edgington) bedingt sein, da bei diesem Test die vorinkubierten Lymphozyten gewaschen und dadurch SIF von der Lymphozytenoberfläche entfernt wurden. Gegen eine Identität zwischen SIF und RIF spricht auch, daß das Molekulargewicht bei RIF 20 - 50-fach höher liegt (2.5×10^6).

IV Bedeutung immunsuppressiver α-Globuline

Im folgenden soll vor allem auf immunsuppressive α-Globuline eingegangen werden, die aus Normalserum isoliert wurden und die vermutlich bei Immunreaktionen erhöht nachweisbar sind. Da SIF nicht nur bei Patienten mit Hepatitis vorkommen, ist möglich, daß sie zu diesen Faktoren gehören.

Bereits 1959 wiesen Kamrin und 1963 Mowbray auf immunsuppressive Eigenschaften von α-Globulinfraktionen hin. Cooperband et al. (1969, 1972) konnten ein mit den α-Globulinen assoziiertes Peptid, das immunregulative α-Globulin (IRA)

isolieren, das sie für die in vitro und in vivo nachgewiesenen Suppressionen zellvermittelter Immunreaktionen verantwortlich machten (siehe Tabelle 22: 11).

Wie SIF wirkt IRA auf frühe Prozesse der Lymphozytenaktivierung. Der Effekt ist ferner reversibel und nicht zytotoxisch. IRA hat keinen Einfluß auf B-Lymphozytenfunktionen, während es für SIF Hinweise für eine Hemmung der B-Zellenstimulation gibt. Die Stimulation von Lymphozyten durch PPD wird durch IRA etwa 4-fach stärker unterdrückt als die Mitogen-induzierte Proliferation (Menzoian et al., 1974; Cooperband et al., 1976).

Diese Beobachtungen schließen nicht aus, daß SIF zu den α-Globulinen gehören, da diese Untersuchungen mit isolierten, angereicherten Faktoren durchgeführt wurden, und es evtl. auch noch andere der α-Globulinfraktion zugehörige immunsuppressive Faktoren gibt, wie die Fraktion C (Milton + Mowbray, 1969), das normale immunsuppressive Protein (Nelken, 1973; Hanna et al., 1975) oder die von Miller (1976) isolierte α-Globulinfraktion.

Auffallende Übereinstimmungen und Parallelen mit den SIF-Befunden bestehen vor allem mit suppressiven Serumfaktoren, die bei tierexperimentellen Untersuchungen nachgewiesen und mit α-Globulinen assoziiert wurden. So berichteten verschiedene Arbeitsgruppen über suppressive Eigenschaften von Mäuseseren, die nach Immunisierung mit Tuberkelbakterien (BCG), Endotoxin (Salmonella typhimurium, E.coli), Schafs- oder Pferdeerythrozyten oder während einer Graft-versus-Host-Reaktion verstärkt nachgewiesen werden können (Nelson, 1972, 1973; Nelson + Shneider, 1974; Veit + Michael, 1972, 1973; Lee + Paraskevas, 1976).

In Übereinstimmung mit SIF hemmten diese Seren die Stimulation von Lymphozyten durch PHA, ConA, LPS sowie die gemischte Lymphozytenreaktion. Die Serumfaktoren wirkten in der frühen Phase der Lymphozytenaktivierung und der Effekt war durch Waschen aufhebbar (siehe Tabelle 22: 11).

Die hemmende Aktivität konnte durch Titration ähnlich reduziert werden wie bei SIF. Veit + Michael zeigten, daß die Hemmung mit den α-Globulinen assoziiert war und Nelson wies durch gelchromatographische Auftrennung eine Hemmung im Albuminpeak nach.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Burger et al. (1973, 1974), die feststellten, daß die α-Globuline zwischen dem 3. - 6. Tag nach einer Immunisierung von Meerschweinchen mit Mycobakterium tuberkulosis oder 2,4-Dinitrofluorbenzol sowie

nach einer Transplantation allogeneischer Haut erhöht nachweisbar waren. Gleichzeitig waren die mit diesen Antigenen durchgeführten Hautteste abgeschwächt (Anergie). In dieser Zeit konnten die Autoren ferner eine Hemmung der PHA-, ConA-, PWM- und PPD-induzierten Lymphozytenproliferation in Vollblutkulturen nachweisen. Ähnlich wie bei den SIF-Untersuchungen trat eine geringere Hemmung bei Stimulation mit ConA auf. Die Wirkung der autologen Seren bei der Stimulation isolierter und gewaschener Lymphozyten wurde hierbei nicht untersucht.

Von besonderer Bedeutung bei diesen Ergebnissen ist die außerordentliche Korrelation von α-Globulinkonzentration im Serum, unspezifischer Suppression der Lymphozytenreaktivität und der Hautanergie.

Burger et al. stellten heraus, daß diese Veränderungen sehr früh nach Antigenexposition auftraten und nach einigen Tagen wieder verschwanden. Sie nahmen an, daß Immunsuppression, α-Globulinerhöhung und Anergie bei persistierenden Antigenen, im Falle von chronischen Infektionen und autoimmunen Prozessen, andauern oder periodisch wieder auftreten können.

Damit übereinstimmend beobachteten Dardas + Mallmann (1966), daß die α-Globuline ungefähr vom 10. Tag an nach Infektion von Meerschweinchen mit lebenden, dagegen nicht mit abgetöteten, Bakterien (Mykobakterium tuberkulosis) bis zum Tode der Tiere deutlich erhöht waren. Die Bildung der α-Globuline stand im Zusammenhang mit der ständigen Reaktion gegenüber den Bakterien.

Über α-Globulinerhöhungen ist auch bei chronischen autoimmunen und malignen menschlichen Erkrankungen sowie nach Transplantationen berichtet worden. Mc Farlin + Oppenheim (1969) fanden, daß Seren von Patienten mit Ataxia teleangiectatika die Mitogenstimulation autologer und homologer Lymphozyten hemmten, daß die Lymphozyten der Patienten nach dem Waschen im Normalserum jedoch gut stimulierbar waren. Bei diesen Patienten beobachteten die Autoren häufig negative Hautreaktionen.

Seren von Patienten mit Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen wiesen erhöhte α_2-Globulinkonzentrationen auf (Riggio et al., 1969) und hemmten die PHA-Stimulation normaler Lymphozyten. Die Hemmung war in der α-Globulinfraktion nachweisbar.

Ähnlich wie Riggio et al. postulierten Veit + Michael (1972), daß suppressive α-Globulinfaktoren normalerweise im Serum in niedriger Konzentration vorkommen und während einer Immunreaktion verstärkt gebildet werden, um in der Zeit höchster Antigenkonzentration eine "Überstimulation" zu verhindern.

Ähnliche Überlegungen wurden von Kantor (1975) angestellt, der vermutete, daß die bei vielen Infektionskrankheiten vorübergehend auftretende anergische Phase eine verstärkte Form einer physiologischen Reaktion nach einer Sensibilisierung darstellt, insbesondere da die Antigene dabei ständig neu gebildet werden. Es ist nicht bekannt, ob die bei sehr vielen Infektionskrankheiten vorübergehend auftretende und bei chronischen Erkrankungen oftandauernde Anergie durch Serumfaktoren aufrechterhalten wird, wie verschiedene Autoren vermuten (Cooperband et al., 1976; Tomasi, 1977; Kantor, 1975).

Die Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen von Yoshida et al. (1976) unterstützen diese Hypothese. Die Autoren konnten nach Immunisieren von Meerschweinchen mit Hühneralbumin und Tuberkulin-PPD einen nicht dialysierbaren Inhibitor aus dem Serum der Tiere isolieren, mit dem nach Übertragung in ein nicht immunisiertes Tier Immunreaktionen unterdrückt werden konnten. Der Faktor wies ein Molekulargewicht von 10-40 000 Dalton auf.

Bei Tumorpatienten fanden Glasgow et al. (1974) eine gute Korrelation zwischen hemmender Serumaktivität und generalisierter Hautanergie. Im Serum der Patienten waren IRA-ähnliche immunsuppressive Peptide in erhöhter Konzentration nachweisbar. Angenommen wird auch, daß Faktoren wie Interferon (De Maeyer et al., 1975), C-reaktives Protein (Mortensen + Gewurz, 1976) sowie α-Fetoprotein (Tomasi, 1977) für die Anergie verantwortlich sind.

Über Häufigkeit und Nachweis der Anergie im Ablauf der akuten und chronischen Hepatitis liegen keine umfangreichen Untersuchungen vor und die wenigen Befunde

sind widersprüchlich. Abgeschwächte Hautreaktionen auf Tuberkulin-PPD während der akuten Virushepatitis beschrieben Brzoko (1974), Pappas et al. (1970) und Wicks et al. (1975) und bei Patienten mit chronischer Hepatitis Sodomann et al. (1974), Nakao et al.(1975) sowie Toh et al. (1973). Andere Autoren wie Tong et al. (1975) sowie Nielsen et al. (1973) konnten diese Befunde nicht bestätigen.

Dwyer + Kantor (1975) zeigten, daß der Zustand der Anergie nach Immunisierung von Meerschweinchen mit Tuberkulin, Albumin oder γ-Globulin durch das "inhibitorische Milieu" und nicht durch die Zellen aufrechterhalten wurde. Einerseits reagierten sensibilisierte Lymphozyten nicht, wenn sie in anergische Tiere injiziert wurden und andererseits führte die Übertragung von Lymphozyten eines im anergischen Zustand befindlichen Tieres in ein unbehandeltes Meerschweinchen wieder zu normaler Reaktivität.

In Übereinstimmung damit haben die Untersuchungen über die Stimulierbarkeit der Lymphozyten von Patienten mit Hepatitis ergeben, daß keine Funktionsstörung der Lymphozyten vorliegt und die Patientenlymphozyten nur in Gegenwart des autologen oder homologen SIF-positiven Serums schlecht stimulierbar waren. Bei einer Patientin allerdings wurde wiederholt eine abgeschwächte Reaktion auf PHA während der akuten Virushepatitis im Unterschied zu einer Kontrolluntersuchung 9 Monate später beobachtet.

Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von Tong et al. (1975), Wicks et al. (1975) und Wands et al. (1975 a), die ebenfalls eine normale Lymphozytenreaktivität bei Patienten mit Hepatitis beschrieben. Sie stehen im Widerspruch zu verschiedenen anderen Untersuchungen, die eine erniedrigte Stimulierbarkeit der Patientenlymphozyten fanden (Willems et al., 1969; Martini et al., 1970; Agarwal et al., 1971; Newble et al., 1975; Andersen et al., 1976).

Für die Interpretation dieser Ergebnisse sind zwei Punkte von Bedeutung:

a) Es lassen sich mit kleinen Kollektiven nur begrenzt Aussagen über eine veränderte Lymphozytenfunktion machen, da erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Mitogen-induzierten Stimulierbarkeit normaler Lymphozyten bestehen (Knoke et al., 1974; Hinz + Chickosky, 1972; Mc Intyre + Cole, 1969; Webel et al.,

1975; Graybill + Alford, 1976). In den Untersuchungen über die Lymphozytenstimulierbarkeit bei Patienten mit Hepatitis blieb die individuell unterschiedliche Reaktionsfähigkeit gegenüber PHA unberücksichtigt, die von Knoke et al. als Hierarchie der Stimulierbarkeit bezeichnet wurde und die auch in den vorliegenden Ergebnissen bei Patienten wie bei Normalpersonen beobachtet werden konnte.

Ferner müssen auch Schwankungen der Stimulationsfähigkeit berücksichtigt werden (Dionigi et al., 1973).

b) Kulturbedingungen und Art der Isolierung sind von Bedeutung. Newble et al. (1975) fanden, daß PHA-stimulierte Lymphozyten von Patienten mit akuter Virushepatitis im autologen und im fötalen Kälberserum deutlich weniger ^{3}H-Thymidin einbauten als die Kontrollymphozyten, wobei allerdings das als Kontrollserum verwandte fötale Kälberserum ebenfalls hemmende Aktivität aufzuweisen scheint.

Diodati et al. (1977) fanden, daß eine anfangs nur schwach nachweisbare Lymphozytotoxizität bei Patienten mit CAH durch gründliches Waschen der Lymphozyten gesteigert werden konnte. Ähnliche Beobachtungen wurden von Bullock + Fasal (1971) bei Antigenstimulationsversuchen mit Lymphozyten von Patienten mit Lepra gemacht. Bei den eigenen Untersuchungen wurden die Lymphozyten 4-mal gewaschen, um einen Einfluß von Serumfaktoren, die an der Lymphozytenmembran haften, möglichst auszuschließen (Horwitz et al., 1977; Hirata + Terasaki, 1972; Wang et al., 1977).

Inwieweit den in vitro-Effekten von SIF auch in vivo suppressive Effekte entsprechen ist nicht bekannt. Geubel et al. (1976) diskutierten, daß suppressive Serumfaktoren möglicherweise zytotoxische Reaktionen der Lymphozyten in der Leber beeinträchtigen können und daher in der Pathogenese der Hepatitis von großer Bedeutung sind. Die Autoren fanden bei Patienten mit chronischen Leberkrankheiten eine erniedrigte Lymphozytotoxizität gegenüber autologen Hepatozyten vor allem, wenn hemmende Serumfaktoren nachweisbar waren. Da Geubel et al. im Zytotoxizitätstest kein Patientenserum zugesetzt hatten, muß angenommen werden, daß entweder suppressive Faktoren an den Lymphozyten hafteten,

daß die Hemmung im Gegensatz zu den SIF-Befunden nicht reversibel war, oder daß die Reaktivität der Lymphozyten erniedrigt war (intrinsic defect).

Auch Edgington + Chisari (1975) vermuteten, daß suppressive Faktoren wie RIF pathogenetisch eine Rolle spielen, in dem sie Effektorreaktionen beeinträchtigen oder die Antigenexpression an der Hepatozytenoberfläche modifizieren. Eine Suppression zytotoxischer Lymphozytenreaktionen in der Leber ist unwahrscheinlich, vor allem, da bei vielen Patienten hochentzündliche Reaktionen auch bei starker SIF-Aktivität auftraten.

Auch die Antiaktivatoreigenschaften von SIF sprechen dafür, daß Immunreaktionen bereits aktivierter Lymphozyten in der Leber durch suppressive Faktoren nicht beeinflußt werden. Dagegen muß angenommen werden, daß Antiaktivatoren im peripheren Blut eine Aktivierung zirkulierender Lymphozyten verhindern oder einschränken.

Nach der Hypothese von Ranney (1977) werden bei einer Immunantwort in zeitlicher Folge regulative Produkte von lymphoiden Zellen freigesetzt, die die Reaktionen von Lymphozyten und Makrophagen in den einzelnen Phasen der Immunantwort beeinflussen. Während eine Immunreaktion spezifisch durch Reaktion immunkompetenter Lymphozyten mit dem Antigen ausgelöst und durch Feedback-Mechanismus, z.B. durch Antikörper, beendet wird, treten intermediär, nach der Aktivierungsphase, zahlreiche nicht spezifisch wirkende stimulierende und suppressive Produkte auf, zu denen nach Ranney Mediatoren der Antigenkompetition gehören. Ranney führt das immunregulative α-Globulin sowie Interferon auf. Nach den vorliegenden Befunden ist vorstellbar, daß SIF zu diesen Faktoren gehören.
Während Ranney in seinem hypothetischen Schema eine Immunreaktion nach einmaliger Antigengabe beschreibt, muß angenommen werden, daß bei einer Infektion die Reaktionen und Reaktionsprodukte so lange auftreten, bis das Antigen eliminiert ist. Bei chronischen Infektionen oder autoimmunen Erkrankungen, bei denen Antigene persistieren, müssen nach dieser Vorstellung die nicht spezifischen Inhibitoren nachweisbar bleiben.

Während Antikörper sowie zellvermittelte Immunreaktionen in vitro in den meisten Fällen lange Zeit nach Beendigung einer Antigen-induzierten Immunantwort oder nach Ausheilung einer Infektion nachweisbar sind, treten diese suppressiven Faktoren nur während bestehender Immunreaktionen auf.

Neben inhibierenden kommen auch stimulierende Faktoren vor (Ranney, 1977; Waksman + Namba, 1976; Voorting-Hawking + Michael, 1977; Dardenne + Bach, 1977; Diamantstein + Naher, 1978) und verschiedene Autoren wiesen darauf hin, daß es bei gleichzeitigem Auftreten zu Interferenzen kommen kann (Douglas + Rubin, 1977; Virelizier et al., 1977; Wicher + Wicher, 1977; Cooperband et al., 1976; Tomasi, 1977; Chase, 1972). Es ist daher denkbar, daß es im SIF-Test dadurch in manchen Fällen zu falsch-negativen Befunden kommen kann.

Welche Zellen diese suppressiven Mediatoren bilden, ist nicht bekannt. Waksman (1977) sowie Namba et al. (1977) postulierten, daß nicht spezifische Suppressorzellen (Folch et al., 1973; Mosier + Johnson, 1975), die die Lymphozytenantigene Ly-1,2,3 im Unterschied zu den spezifischen Suppressorzellen mit Ly-2,3 (Cantor et al., 1976) aufweisen, den Inhibitor der DNS-Synthese (IDS) bilden. Das Molekulargewicht dieses nicht spezifischen Mediators beträgt 75-80 000 Dalton. Im Unterschied zu SIF ist IDS bis zu 80° C hitzeresistent und wirkt nur während der 16. - 24. Stunde der Lymphozytenaktivierung, d.h. zum Beginn der DNS-Synthese (Jegasothy et al., 1976).

IDS wird in vitro während einer Mitogenstimulation, nach Kontakt sensibilisierter Lymphozyten mit dem spezifischen Antigen oder von Lymphozyten der Ratten gebildet, die 24 Stunden vorher mit einer hohen Antigendosis (100 mg Ovalbumin) immunisiert wurden (Namba + Waksman, 1975; Namba et al., 1977).
Waksman nimmt an, daß nicht spezifische Suppressorzellen z.B. bei chronischen Infektionen oder Graft-versus-Host-Reaktionen sowie bei der Antigenkompetition den immunsuppressiven Faktor IDS bilden. So konnten Jayawardena + Waksman (1977) durch Infektion von Mäusen mit Trypanosomen eine Zunahme der Aktivität unspezifischer Suppressorzellen hervorrufen.

Ferner kommen Makrophagen als Bildungszellen für suppressive Faktoren in Betracht, sie sind an einer Vielzahl von Immunreaktionen beteiligt und bilden hierbei häufig Monokine, wie z.B. den T-Lymphozyten-aktivierenden Faktor (lymphocyte activating factor; LAF; Gery + Waksman, 1972), den B-Lymphozyten-aktivierenden Faktor (BAF; Wood + Gaul, 1974) oder den Low Molekular Weight Suppressor (LMWS; Lopatin + Ranney, 1977).
Verschiedene Autoren konnten zeigen, daß die Überstände von Makrophagenkulturen die spontane und Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation hemmten (Waldman + Gottlieb, 1973; Nelson, 1973; Calderon et al., 1974; Keller, 1975; Chen et al., 1977).
Neben hemmenden Faktoren fanden Calderon + Unanue (1975) auch stimulierende Aktivitäten in Makrophagenüberständen und Lee + Berry (1977) gelang die Trennung kleinerer Makrophagen mit stimulierenden Eigenschaften von größeren Makrophagen mit suppressiven Eigenschaften.

Für eine Beteiligung der Makrophagen bei der Immunsuppression spricht, daß nach den Untersuchungen von Sjöberg (1972) die Lymphozyten von Tieren mit Graft-versus-Host-Reaktionen nach Entfernen von Makrophagen, nicht aber der T-Lymphozyten, durch Mitogene und Antigene stimulierbar waren. Ferner konnten Mc Master + Levy (1975) zeigen, daß die Seren von Mäusen mit chronischen Graft-versus-Host-Reaktionen ebenfalls suppressive Aktivität aufwiesen.

Scott (1972) sowie Kirchner et al. (1975 a) beschrieben, daß aktivierte Makrophagen aus Mäusen, denen Corynebakterium parvum injiziert wurde, die Mitogen- und Alloantigen-induzierte Lymphozytenproliferation supprimierten. Ähnliche Beobachtungen wurden nach Injektion von Mykobakterium tuberkulosis (Mitchell et al., 1973) oder von Pepton (Keller, 1975) sowie bei Tumor-tragenden Tieren (Pope et al., 1976; Kirchner et al., 1975 b) gemacht.

Nach Nelson (1976) spielen die Makrophagen bei der Lepra, Histoplasmose und Syphilis und möglicherweise auch bei anderen Infektionskrankheiten, bei denen hemmende Serumfaktoren oder eine Immunsuppression beschrieben sind, eine wichtige Rolle. Kirchner et al. (1977) schlossen aus ihren Versuchen, daß die er-

niedrigte Mitogenstimulation von Mäuselymphozyten in Gegenwart von Herpesviren durch einen Virus-induzierten Faktor der Makrophagen verursacht wurde.

Die von verschiedenen Autoren beschriebene hemmende Aktivität im Serum normaler Mäuse fand sich auch in Thymus-losen ("nude") oder in B-Lymphozyten-verarmten Mäusen (thymektomiert, Röntgen-bestrahlt und mit Knochenmarkszellen rekonstituiert) - andererseits wiesen Seren von Mäusen nach einer Makrophagenaktivierung erhöhte suppressive Aktivität auf (Nelson, 1973, 1976). Die Makrophagen der Tiere wurden dabei durch Infektion mit Mykobakterium tuberkulosis, bzw. Salmonella enteritides oder durch Induktion einer Graf-versus-Host-Reaktion aktiviert.

Eine direkte Korrelation zwischen Makrophagenproliferation und erhöhter suppressiver Serumaktivität bestand dabei allerdings nicht und die Hemmung durch Makrophagenüberstände war häufig nicht sehr stark. Nelson war aufgrund dieser Untersuchungen der Ansicht, daß Makrophagen Mediatoren der Antigenkompetition bilden können (Pross + Eidinger, 1974).

V Klinische Relevanz von SIF

Die Untersuchungen haben ergeben, daß bei verschiedenen Formen der Hepatitis eine gute Übereinstimmung zwischen dem Nachweis von Serumhemmfaktoren und der Krankheitsaktivität bestand.

Bei der akuten Virushepatitis war der Serumfaktor nur in der späten Inkubationsphase und frühen akuten Phase nachweisbar und fehlte bei allen Patienten nach der Ausheilung. Während bei Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis nur vereinzelt und am Anfang des Krankheitsverlaufes eine Hemmung gefunden werden konnte, waren bei Patienten mit aktiver CAH und Leberzirrhose in den meisten Fällen nachweisbar. Obwohl nicht bei allen Patienten mit CAH eine Hemmung der Lymphozytenstimulation durch Serum gefunden wurde, erleichtert der Nachweis von SIF die Differentialdiagnose zwischen einer CPH und einer CAH.

In einer Doppelblindstudie mit der Medizinischen Klinik (Prof. Wildhirt) und dem Pathologischen Institut in Kassel (Prof. Klinge) wurden SIF-Bestimmungen bei 140 Patienten mit HB_sAg-positiver Hepatitis über einen Zeitraum von 3 Jahren durchgeführt. In 84 % der Fälle bestand eine Übereinstimmung zwischen dem histologischen Befund und der SIF-Aktivität (Ortmans et al., 1977).

Verlaufskontrollen an 24 Patienten dieser Studie mit einer protrahiert verlaufenden Hepatitis, d.h. die sechs Monate nach der akuten Virushepatitis histologisch und biochemisch noch entzündliche Aktivität zeigten, ergaben eine eindeutige Differenzierung zwischen progressiven und nicht progressiven Krankheitsverläufen. Seren von zwei Patienten, die eine Leberzirrhose bzw. CAH entwickelten, wiesen über den Beobachtungszeitraum von 18 Monaten eine starke SIF-Aktivität auf. Keine Hemmung fand sich dagegen 12 - 18 Monate nach Beginn der Kontrollen bei den Patienten, die im Laufe der Beobachtung ausheilten, bei denen weiterhin eine protrahiert verlaufende Hepatitis vorlag oder die eine chronisch persistierende Hepatitis entwickelten.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden ferner Patienten mit einer juvenilen lupoiden Hepatitis kontrolliert. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein eigenes Krankheitsbild (Mackay et al., 1956; Maclachlan et al., 1965; Berg et al., 1977). Die Erkrankung, die wie eine akute Hepatitis beginnen kann, geht in kurzer Zeit in eine chronisch aktive Hepatitis über und es ist notwendig, die Patienten mehrere Jahre immunsuppressiv zu behandeln.

Bei diesen Patienten war die SIF-Aktivität über einen Zeitraum von 1 -3 Jahren, insbesondere in dem ersten Jahr nach Krankheitsbeginn, stark ausgeprägt. Ein Absetzen der Therapie bei gleichzeitigem Nachweis starker SIF-Aktivität führte bei 4 Patienten zu einem Schub.

Verschiedene Arbeitsgruppen vermuteten, daß der Nachweis suppressiver Serumfaktoren insbesondere bei chronischen Erkrankungen von Bedeutung ist. So berichteten Moorthy et al. (1976), daß Seren von 7 Patienten mit "Minimal-Change" Nephrotischem Syndrom im aktiven Stadium hemmende Aktivität aufwiesen, während sie in Remissionen normal reagierten. Die Autoren konnten hemmende Faktoren in den Seren von 21 Patienten mit anderen Formen von nephrotischem Syndrom

oder anderen Glomerulaerkrankungen nicht feststellen.
Eine Beziehung zur Krankheitsaktivität wurde auch bei Patienten mit Lepra (Nelson et al., 1975; Bjune + Barnetson, 1976), Syphilis (Levene et al., 1969), Malaria (Moore et al., 1977), Ataxia teleangiectatica (Mc Farlin + Oppenheim, 1969), subakut sklerosierender Panencephalitis (Swick et al., 1976), bei Kindern mit wiederholten Infekten (Fitzgerald + Hosking, 1976) sowie bei Patienten mit Tumor (Humphrey et al., 1975) diskutiert (siehe Tabelle 21).

Bei der chronischen Hepatitis werden als prognostische Indikatoren vor allem die Immunglobulinkonzentrationen und der Nachweis von Autoantikörpern gegen Kerne und glatte Muskulatur angesehen. Neuerdings nimmt man an, daß die Bestimmung von Antikörpern gegen leberspezifisches Lipoprotein (anti-LSP) und von membrangebundenen Antikörpern nicht nur für die Klassifizierung chronischer Hepatitiden, sondern auch für die Prognose von Bedeutung ist. Vorläufige Untersuchungen mit der Arbeitsgruppe Eddleston et al., Kings College Hospital in London, zeigen, daß anti-LSP-Antikörper mit dem Ausbruch der akuten Virushepatitis nachweisbar sind und mit der entzündlichen Aktivität abnehmen. Im Gegensatz zu SIF treten diese Antikörper aber nicht in der Inkubationsphase auf. Anti-LSP-Antikörper kommen nur in niedriger Konzentration vor und sind deshalb nur radioimmunologisch zu erfassen. Bisherige Ergebnisse sprechen dafür, daß durch die Bestimmung beider Parameter besser zur Prognose der chronischen Hepatitis Stellung genommen werden kann.

Aus den vorliegenden Untersuchungen und den entsprechenden Ergebnissen der relevanten Literatur darf angenommen werden, daß die Seruminhibitionsfaktoren zu den nicht spezifischen suppressiven Faktoren gehören. Die größten Übereinstimmungen bestanden mit den suppressiven α-Globulinen, die vor allem nach starker oder persistierender Antigenstimulation gebildet werden und von denen postuliert wird, daß sie Indikatoren für eine fortbestehende Immunreaktion sind.

Vermutlich spielen diese Faktoren keine Rolle bei der Amplifizierung von Immunreaktionen. Wahrscheinlicher ist, daß sie eine regulative Funktion haben und z.B. eine Aktivierung von Lymphozyten durch andere Antigene unterdrücken (Antigenkompetition).

In den letzten Jahren haben die Kenntnisse auf dem Gebiet der Mediatoren einer Immunantwort stark zugenommen (1. Internationaler Workshop über Wirkungsmechanismen und Charakterisierung von Lymphozytenmediatoren, 1976) und dieses Forschungsgebiet gewinnt für die Klinik zunehmend an Bedeutung (Cohen et al., 1977; Krakauer et al., 1976; Papermaster et al., 1976; Wang et al., 1977).

Eine der Hauptschwierigkeiten besteht darin, daß bei der Vielzahl beschriebener Aktivitäten in Kulturüberständen und Seren spezifische Nachweismethoden weitgehend fehlen, und die meist ungenügend charakterisierten Faktoren bisher mit biologischen Testen nachgewiesen werden. Bestimmungen mit Hilfe von Antikörpern sind nicht möglich. So ist neben der immunbiologischen Charakterisierung die Isolierung der Faktoren vordringlich.

E ZUSAMMENFASSUNG

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß in der Inkubationsphase und frühen Phase der akuten Virushepatitis suppressive Faktoren im Serum (Seruminhibitionsfaktoren = SIF) auftreten, die im Laufe der Entzündung verschwinden. Verlaufsbeobachtungen an Patienten mit chronischer Hepatitis haben eine gute Übereinstimmung zwischen der SIF-Aktivität und dem Krankheitsverlauf ergeben, so daß angenommen werden kann, daß der SIF-Nachweis für eine Beurteilung einer chronischen Hepatitis von Bedeutung ist.

Zunächst konnte gezeigt werden, daß die Hemmung der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation durch SIF-positive Seren nicht aufgrund unspezifischer Veränderungen des Kulturmediums durch das Patientenserum hervorgerufen wurde, wie z.B. Bindung von Mitogen an Proteine des Patientenserums oder durch Nährstoffmangel.
Reproduzierbare SIF-Effekte ergaben sich im Standardtest bei Stimulation mit optimalen Mitogenkonzentrationen, unter Verwendung von Medium, das 10 % Normalserum als Nährstoffquelle enthielt, und unter Einbeziehung von drei Normalseren als Kontrolle.

Untersuchungen mit 22 Standardseren unterschiedlicher SIF-Aktivität ergaben:

1. Seruminhibitionsfaktoren wirkten nicht zytotoxisch und die Hemmung war reversibel.
2. SIF hemmten die Mitogen-induzierte Proliferation autologer, homologer und heterologer Lymphozyten im Gegensatz zur Proliferation von Ehrlich Aszites Tumorzellen.
3. Die Faktoren supprimierten die Stimulation normaler Lymphozyten durch PHA, ConA, Limalektin, Pokeweedmitogen und Staphylokokkenprotein A bei verschiedenen Konzentrationen sowie unterschiedlicher Kulturdauer.
4. In Gegenwart SIF-positiver Seren war die Antigen-induzierte Lymphozytenproliferation unterdrückt und die Lymphokin-induzierte Leukozytenmigrationshemmung deutlich eingeschränkt.

5. Kinetische Untersuchungen ergaben, daß SIF 12 - 18 Stunden vor oder nach Beginn der Lymphozytenaktivierung auf die Lymphozyten einwirken müssen, damit die Hemmung vollständig nachweisbar wird. Zugabe SIF-positiver Seren im Ablauf der Lymphozytenstimulation führte zu einer zeitabhängigen Reduktion der Inhibition. Eine Vorinkubation der Lymphozyten mit SIF hatte keinen Einfluß auf die Hemmung. Ein Effekt auf die intermediäre Aktivierungsphase (RNS-, Proteinstoffwechsel) wird diskutiert.
6. Nach gelchromatographischer Auftrennung SIF-positiver Seren war die SIF-Aktivität im Albuminpeak nachweisbar, der verschiedene α- und β-Globuline enthielt. Der Molekulargewichtsbereich liegt bei 50 - 120 000 Dalton.

Nicht untersucht wurde bisher der Einfluß von SIF auf zytotoxische in vitro Reaktionen und die Antikörpersynthese.
Es wird diskutiert, daß SIF zu den suppressiven α-Globulinen gehören, die vor allem nach starker und persistierender Antigenstimulation gebildet werden und mit der hierbei beobachteten Hautanergie gegenüber spezifischen und unspezifischen Antigenen in Zusammenhang stehen.

F LITERATURVERZEICHNIS

Agarwal, S.S., B.S. Blumberg, B.J.S. Gerstley, W.T. London, I. Millman, A.I. Sutnick, L.A. Loeb. 1971. Lymphocyte transformation and hepatitis. I. Impairment of thymidine incorporation and DNA polymerase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137: 1498-1502.

Almeida, J.D., D. Rubinstein, E.J. Scott. 1971. New antigen-antibody system in Australia antigen-positive hepatitis. Lancet II: 1225-1227.

Andersen, P., K. Thestrup-Pedersen, K. Ladefoged. 1976. Studies of smooth-muscle antibodies in acute hepatitis. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C 84: 365-371.

Auer, I.O., H.G. Kress. 1977. Suppression of the primary cell-mediated immune response by human α_1-fetoprotein in vitro. Cell. Immunol. 30: 173-179.

Ax, W., C. Tautz. 1974. Assay of leucocyte migration inhibition under agarose. Behring. Inst. Mitt. 54: 72-80.

Barker, L.F., F.V. Chisari, P.P. Mc Grath, D.W. Dalgard, R.L. Kirschstein, T.S. Almeida, D.G. Edgington, D.G. Sharp, M.R. Peterson. 1973. Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees. J. Infect. Dis. 127: 648-662.

Baroyan, O.V., I.F. Barinsky, A.A. Shatkin. 1970. Inhibitory effect of sera from patients with Botkin's viral hepatitis on the differentiation and mitotic activity of lymphocytes and integrity of their chromosomes in the course of serial passaging in vitro. Acta Virol. 14: 324.

Belcher, R.W., J.F. Carney, G.A. Nankervis. 1974. Effect of sera from patients with sarcoidosis on in vitro lymphocyte response. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 46: 183-190.

Benson, M.D., M.A. Aldo-Benson, T. Shirhama, Y. Borel, A.S. Cohen. 1975. Suppression of in vitro antibody response by a serum factor (SAA) in experimentally induced amyloidosis. J. Exp. Med. 142: 236-241.

Berg, P.A., N. Brattig, W. Gerlich. 1977. Juvenile lupoid hepatitis - a clinical entity. in: 12th Meeting of European Association for the Study of the Liver (EASL), (Karger, Basel), Nr. 92 (Abstr.).

Berquist, K.R., J.M. Peterson, B.L. Murphy, J.W. Ebert, J.E. Maynard, R.H. Purcell. 1975. Hepatitis B antigens in serum and liver of chimpanzees acutely infected with hepatitis B virus. Infect. Immun. 12: 602-605.

Bertrams, J., E. Kuwert, H. Selmair, H.E. Reis, W. Wiese. 1976. Autoantikörper gegen Lymphozyten (CoCoCy) bei Patienten mit verschiedenen Formen der Hepatitis und Cirrhose. Klin. Wschr. 54: 227-233.

Bessler, W., J. Saal, M. Hadam, P. Rieber. 1976. Stimulation of subpopulations of normal and leukemic human lymphocytes with Lima Bean Lectin. 7. Arbeitstagung über Leukozytenkulturen, Ulm, März 1976.

Bjune, G., R. Barnetson. 1976. Plasma factors in delayed-type hypersensitivity. Augmentation of lymphocyte responses in borderline leprosy reactions. Clin. Exp. Immunol. 26: 397-402.

Blanden, R.V. 1971. Mechanisms of recovery from a generalized viral infection: Mouse pox. II. Passive transfer of recovery mechanisms with immune lymphoid cells. J. Exp. Med. 133: 1074-1089.

Blomgren, H., H. Strander, K. Cantell. 1974. Effect of human leukocyte interferon on the response of lymphocytes to mitogenic stimuli in vitro. Scand. J. Immunol. 3: 697-705.

Bloom, B.R., J. Gaffney, L. Jimenez. 1972. Dissociation of MIF production and cell proliferation. J. Immunol. 109: 1395-1398.

Blumberg, B.S., H.J. Alter, S. Visnich. 1965. A 'new' antigen in leukemia sera. J. Amer. Med. Ass. 191: 541-546.

Booth, R.J., J.M. Booth, J. Marbrook. 1976. Immune conservation: a possible consequence of the mechanism of interferon-induced antibody suppression. Eur. J. Immunol. 6: 769-772.

Böyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granuloctes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (suppl. 97): 77-89.

Brattig, N., P.A. Berg. 1976. Serum inhibitory factors (SIF) in patients with acute and chronic hepatitis and their clinical significance. Clin. Exp. Immunol. 25: 40-49.

Brodeur, B.R., T.C. Merigan. 1974. Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice. J. Immunol. 113: 1319-1325.

Bruley-Rosset, M., H.G. Botto, A. Goutner. 1977. Serum migration inhibitory activity in patients with infectious diseases and various neoplasia. Eur. J. Cancer 13: 325-327.

Brzosko, W.J., H. Swiderska, I. Szymanska, R. Debski, P.V. Holland. 1974. D.N.C.B. test in hepatitis. Lancet II: 155-156.

Bullock, W.E., P. Fasal. 1971. Studies of immune mechanisms in leprosy. III. The role of cellular and humoral factors in impairment of the vitro immune response. J. Immunol. 106: 888-898.

Burger, D.R., D.P. Lilley, M. Reid, L. Irish, R.M. Vetto. 1973. Alpha globulin changes during the development of cellular immunity. Cell. Immunol. 8: 147-154.

Burger, D.R., D.P. Lilley, R.M. Vetto. 1974. Lymphocyte suppression associated with alpha globulin changes in cellular immunity. Cell. Immunol. 10: 432-441.

Calderon, J.,R.T. Williams, E.R. Unanue. 1974. An inhibitor of cell proliferation released by cultures of macrophages. Proc. Natl .Acad. Sci. USA 71: 4273-4277.

Calderon, J., E.R. Unanue. 1975. Two biological activities regulating cell proliferation found in cultures of peritoneal exudate cells. Nature (Lond.) 253: 359-361.

Canales, L., J.M. Louro, R.O. Middlemas, M.A. South. 1969. Immunological observations in chronic mucocutaneous candidiasis. Lancet II: 567-571.

Cantor, H., F.W. Shen, E.A. Boyse. 1976. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different lymphocyte components. II. Activation by antigen: After immunization, antigen specific suppressor and helper activities are mediated by destinct T-cell subclasses. J. Exp. Med. 143: 1391-1401.

Cappel, R., F. De Cuyper, D. van Beers. 1977. e antigen and antibody, DNA polymerase, and inhibitors of DNA polymerase in acute and chronic hepatitis. J. Infect. Dis. 136: 617-622.

Charpentier, B., R.D. Guttmann, J. Shuster, P. Gold. 1977. Augmentation of proliferation of human mixed lymphocyte culture by human α-fetoprotein. J. Immunol. 119: 897-900.

Chase, P.S. 1972. The effects of human serum fractions on phytohemagglutinin- and concanavalin A-stimulated human lymphocyte cultures. Cell. Immunol. 5: 544-554.

Chen, P.C., E. Gaetjens, J.D. Broome. 1977. Macroglobulin inhibitory factor for lymphoid cells produced by mouse macrophages. Immunology 33: 391-398.

Chisari, F.V. 1977. Immunoregulatory properties of human plasma in very low density lipoproteins. J. Immunol. 119: 2129-2136.

Chisari, F.V., T.S. Edgington. 1975. Lymphocyte E rosette inhibitory factor: A regulatory serum lipoprotein. J. Exp. Med. 142: 1092-1107.

Chisari, F.V., J.A. Routenberg, T.S. Edgington. 1976. Mechanisms responsible for defective human T-lymphocyte sheep erythrocyte rosette function associated with hepatitis B virus infections. J. Clin. Invest. 57: 1227-1238.

Chisari, F.V., J.A. Routenberg, M. Fiala, T.S. Edgington. 1977. Extrinsic modulation of human T-lymphocyte E rosette function associated with prolonged hepatocellular injury after viral hepatitis. J. Clin. Invest. 59: 134-142.

Chiu, K.M., R.F. Mortensen, A.P. Osmand, H. Gewurz. 1977. Interactions of alpha$_1$-acid glycoprotein with the immune system. I. Purification and effects upon lymphocyte responsiveness. Immunology 32: 997-1005.

Clausen, J.E.. 1971. Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium. Acta Allergol. 26: 56-80.

Cochrane, A.M.G., A. Moussouros, A. Smith, A.D. Thomson, A.L.W.F. Eddleston, R. Williams. 1976 a. Autoimmune reaction to a liver-specific membrane antigen during acute viral hepatitis. Gut 17: 714-718.

Cochrane, A.M.G., A. Moussouros, A.D. Thomson, A.L.W.F. Eddleston, R. Williams. 1976 b. Antibody-dependent cell-mediated (K cell) cytotoxicity against isolated hepatocytes in chronic active hepatitis. Lancet I: 441-444.

Cohen, S., J. David, M. Feldmann et al.. 1977. Current state of studies of mediators of cellular immunity: A progress report. Cell. Immunol. 33: 233-244.

Colombo, M.,S.J. Vernace, F. Paronetto. 1977. T and B lymphocytes in patients with chronic active hepatitis (CAH). Clin. Exp. Immunol. 30: 4-9.

Cooperband, S.R., R.C. Davis, K. Schmid, J.A. Mannick. 1969. Competitive blockade of lymphocyte stimulation by a serum immunoregulatory alpha globulin (IRA). Transpl. Proc. 1: 516-523.

Cooperband, S.R., A.M. Badger, R.C. Davis, K. Schmid, J.A. Mannick. 1972. The effect of immunoregulatory α-globulin (IRA) upon lymphocytes in vitro. J. Immunol. 109: 154-163.

Cooperband, S.R., R. Nimberg, K. Schmid, J.A. Mannick. 1976. Humoral immunosuppressive factors. Transplant. Proc. 8: 225-242.

Crowther, D., G.H. Fairley, R.L. Sewell. 1969. Lymphoid cellular responses in the blood after immunization in man. J. Exp. Med. 129: 849-870.

Dane, D.S., C.H. Cameron, M. Briggs. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet I: 695-698.

Dardas, T.J., V.H. Mallmann. 1966. Electrophoretic and immunoelectrophoretic studies of sera from normal, tuberculous, and non infected tuberkulin-sensitive guinea pigs. J. Bacteriol. 92: 76-81.

Dardenne, M., J.F. Bach. 1977. Demonstration and characterization of a serum factor produced by activated T cells. Immunology 33: 643-651.

Dattwyler, R.J., T.B. Tomasi. 1975. Inhibition of sensitization of T-cells by alpha-fetoprotein. Int. J. Cancer 16: 942-945.

De Gast, G.C., B. Houwen, H.O. Nieweg. 1973. Specific lymphocyte stimulation by purified heat-inactivated hepatitis-B antigen. Brit. Med. J. 4: 707-709.

De Groote, J., V.J. Desmet, P. Gedigk, G. Korb, H. Popper, H. Poulsen, P.J. Scheuer, M. Schmid, H. Thaler, E. Uehlinger, W. Wepler. 1968. A classification of chronic hepatitis. Lancet II: 626-628.

De Horatius, R.J., R.G. Strickland, R.L. Williams. 1974. T and B lymphocytes in acute and chronic hepatitis. Clin. Immunol. Immunopathol. 2: 353-360.

De Horatius, R.J., C. Henderson, R.G. Strickland. 1976. Lymphocytotoxins in acute and chronic hepatitis. Characterization and relationship to changes in circulating T lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 26: 21-27.

De Maeyer, E., J. De Maeyer-Guignard, M. Vandeputte. 1975. Inhibition by interferon of delayed-type hypersensitivity in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1753-1757.

De Moura, M.C., S.J. Vernace, F. Paronetto. 1975. Cell-mediated immune reactivity to hepatitis B surface antigen in liver diseases. Gastroenterology 69: 310-317.

Diamantstein, T., H. Naher. 1978. Specific immune response enhancing factor in serum of immunised mice. Nature (Lond.) 271: 257-259.

Diodati, G., F. Bartolotti, S. Carniello, G. Realdi. 1977. Phytohaemagglutinin (PHA) induced lymphocyte cytotoxicity in chronic active hepatitis (CAH) and in HB$_S$Ag chronic healthy carriers (CHC). in: 12th Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) (Karger, Basel), Nr. 128 (Abstr.).

Dionigi, R., A. Zonta, F. Albertario, R. Galeazzi, G. Bellinzona. 1973. Cyclic variation in the response of lymphocytes to phytohemagglutinin in healthy individuals. Transplantation 16: 550-557.

Douglas, G.N., A.S. Rubin. 1977. Non-specific suppression of the initiation of the immune response to a heterologous immunogen by supernatants from specifically stimulated, primed lymphoid cells. Immunology 32: 669-679.

Dudley, F.J., R.A. Fox, S. Sherlock. 1972. Cellular immunity and hepatitis-associated Australia-antigen liver disease. Lancet I: 723-726.

Dunlop, M.B.C., P.C. Doherty, R.M. Zinkernagel, R.V. Blanden. 1977. Cytotoxic T cell response to lymphocytic choriomeningitis virus. Properties of precursors of effector T cells, primary effector T cells and memory T cells in vitro and in vivo. Immunology 33: 361-368.

Dwyer, J.M., F.S. Kantor. 1975. In vivo suppression of delayed hypersensitivity: Prolongation of desensitization in guinea pigs. J. Exp. Med. 142: 588-599.

Eddleston, A.L.W.F., R. Williams. 1974. Inadequate antibody response to HBAg or suppressor T-cell defect in development of active chronic hepatitis. Lancet II: 1543-1545.

Eddleston, A.L.W.F., R. Williams. 1976. The role of immunological mechanisms in chronic hepatitis. Ann. Clin. Res. 8: 162-173.

Edgington, T.S., F.V. Chisari. 1975. Immunological aspects of hepatitis B virus infection. Amer. J. Med. Sci. 270: 213-227.

Edgington, T.S., E.F. Plow. 1976. Suppression of lymphocyte function by physiological cleavage peptides of human fibrinogen. Fed. Proc. 35: 1318 (Abstr.).

Feinstone, S.M., A.Z. Kapikian, R.H. Purcell. 1973. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. Science 182: 1026-1028.

Feinstone, S.M., A.Z. Kapikian, R.H. Purcell, H.J. Alter, P.V. Holland. 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or type B. N. Engl. J. Med. 292: 767-770.

Fitzgerald, M.G., C.S. Hosking 1976. Plasma inhibitors of lymphocyte response to phytohaemagglutinin in children with recurrent infections. Immunology 30: 33-42.

Folch, H., M. Yoshinaga, B.H. Waksman. 1973. Regulation of lymphocyte responses in vitro. III. Inhibition by adherent cells of the T-lymphocyte response to phytohemagglutinin. J. Immunol. 110: 835-839.

Forsgren, A., A. Svedjelund, H. Wigzell. 1976 a. Lymphocyte stimulation by protein A of Staphylococcus aureus. Eur. J. Immunol. 6: 207-213.

Forsgren, A., A. Svedjelund, H. Wigzell. 1976 b. Protein A from Staphylococcus as a human lymphocyte mitogen. in: In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity. (Hrsg. B.R. Bloom u. J.R. David. Academic Press, New York) S.193-196.

Fox, R.A., F.J. Dudley, M. Samuels, J. Milligan, S. Sherlock. 1973. Lymphocyte transformation in response to phytohaemagglutinin in primary biliary cirrhosis: The search for a plasma inhibitory factor. Gut, 14: 89-93.

Gajdusek, D.C.. 1957. An auto-immune reaction against human tissue antigens in certain acute and chronic diseases. Nature (Lond.) 179: 666.

Galbraith, R.M., A.L.W.F. Eddleston, M.G.M. Smith, R. Williams, R.N.M. Mac Sween, G. Watkinson, H. Dick, L.A. Kennedy, J.R. Batchelor. 1974. Histocompatibility antigens in active chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis. Br. Med. J. 3: 604-605.

Geha, R.S., E. Merler. 1974.
Response of human thymus-derived (T) and non-thymus-derived (B) lymphocytes to mitogenic stimulation in vitro. Eur. J. Immunol. 4: 193-199.

Gery, J., B.H. Waksman. 1972. Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). J. Exp. Med. 136: 143-155.

Geubel, A.P., R.H. Keller, W.H.J. Summerskill, E.R. Dickson, T.B. Tomasi, R.G. Shorter. 1976. Lymphocyte cytotoxicity and inhibition studied with autologous liver cells: Observations in chronic active liver disease and the primary biliary cirrhosis syndrome. Gastroenterology 71: 450-456.

Girmann, G., H. Pees, G. Schwarze, P.G. Scheurlen. 1976. Immunosuppression by micromolecular fibrinogen degradation products in cancer. Nature (Lond.) 259: 399-401.

Glasgow, A.H., R.B. Nimberg, J.O. Menzoian, I. Saporoschetz, S.R. Cooperband, K. Schmid, J.A. Mannick. 1974. Association of anergy with an immunosuppressive peptide fraction in the serum of patients with cancer. N. Engl. J. Med. 291: 1263-1267.

Goeken, N.E., J.S. Thompson. 1977. Conditions affecting the immunosuppressive properties of human α-fetoprotein. J. Immunol. 119: 139-142.

Goldstein, I.J., L.L. So, Y. Yang, Q.C. Callies. 1969. Protein-carbohydrate interaction. XIX. The interaction of concancavalin A with IgM and the glycoprotein phytohemagglutinins of the waxbean and the soybean. J. Immunol. 103: 695-698.

Gorczynski, R., S. Kontiainen, N.A. Mitchison, R.E. Tigelaar. 1974. Antigen-antibody complexes as blocking factors on the T lymphocyte surface. in: Cellular selection and regulation in the immune response (Hrsg. G.M. Edelman, Raven Press, New York), S. 143-154.

Gramse, M., C. Löffler, M. Schmidt, K. Havemann. 1977. Die Bildung niedermolekularer Fibrinogenopeptide durch granulozytäre Elastase und ihr Einfluß auf Lymphozytenproliferation, Granulozyten- und Makrophagenmigration. Z. Immun. Forsch. 153: 302 (Abstr.).

Graybill, J.R., R.H. Alford. 1976. Variability of sequential studies of lymphocyte blastogenesis in normal adults. Clin. Exp. Immunol. 25: 28-35.

Greaves, M., G. Janossy, M. Doenhoff. 1977. Selective trigging of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens. J. Exp. Med. 140: 1-18.

Gupta, S., R.A. Good. 1977. α-fetoprotein and human lymphocyte subpopulations. J. Immunol. 118: 405-408.

Gutmann, W., F. Scheiffarth, H. Wamatz. 1975. Untersuchungen zur zellbedingten Immunreaktion bei akuter und chronischer Hepatitis. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. (Hrsg. B. Schlegel, Bergmann, München), S. 1368-1371.

Hanna, N., R. Kalderon, D. Nelken. 1975. Inhibition of T- and B-lymphocyte functions by normal immunosuppressive protein. Immunology 29: 433-444.

Havemann, K., S. Bürger, H.M. Dosch. 1970. Phytohämagglutinin (PHA) und Serumproteine in der Lymphozytenkultur. II. Die Präzipitation von Serumproteinen durch PHA. Z. Ges. Exp. Med. 153: 308-323.

Heilman, D.H., W. Mc Farland. 1966. Inhibition of tuberculin induced mitogenesis in cultures of lymphocytes from tuberculous donors. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 30: 58-66

Heilman, D.H., M.R. Gambrill, J.P. Leichner. 1973. The effect of hydrocortisone on the incorporation of tritiated thymidine by human blood lymphocytes cultured with phytohaemagglutinin and pokeweed mitogen. Clin. Exp. Immunol. 15: 203-212.

Hill, D.A., J.H. Walsh, R.H. Purcell. 1971. Failure to demonstrate circulating interferon during incubation period and acute stage of transfusion-associated hepatitis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136: 853-856.

Hinz, C.F., J.F. Chickosky. 1972. Factors influencing the stimulation of human lymphocytes by antigen during culture in vitro. Conditions for lymphocyte stimulation. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 42: 836-851.

Hirata, A.A., P.I. Terasaki. 1972. Masking of human transplantation antigens by diverse substances. J. Immunol. 108: 1542-1550.

Hodgson, H.J.F., J.R. Wands, K.J. Isselbacher. 1977. Suppressor lymphocytes: Their role in modulating the immune response in acute and chronic active hepatitis. Gastroenterology 72: 1070 (Abstr.).

Horwitz, D.A., J.B. Cousar. 1975. A relationship between impaired cellular immunity, humoral suppression of lymphocyte function and severity of systemic lupus erythematosus. Amer. J. Med. 58: 829-835.

Horwitz, D.A., M.A. Garrett, A.H. Craig. 1977. Serum effects on mitogenic reactivity in subjects with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and skleroderma. Technical considerations and lack of correlation with anti-lymphocyte antibodies. Clin.Exp. Immunol. 27: 100-110.

Howlett, S.A., J.E. Mc Guigan. 1975. Inhibition of macrophage migration in response to hepatitis B_s antigen. Gastroenterology 69: 960-964.

Hug, G., 1976. Genetic factors and autoimmunity in viral hepatitis. Am. J. Clin. Path. 65: 870-875.

Humphrey, G.B., L. Peterson, M. Whalen, D.E. Parker, J. Lankford, W. Krivit, M. Nesbit. 1975. Lymphocyte transformation in leukemic serum. Cancer 35: 1341-1345.

Husby, G., J.B. Natvig. 1974. A serum component related to nonimmunoglobulin amyloid protein AS, a possible precursor of the fibrils. J. Clin. Invest. 53: 1054-1061.

Hsu, C.C.S., C.M. Leevy. 1971. Inhibition of PHA-stimulated lymphocyte transformation by plasma from patients with advanced alcoholic cirrhosis. Clin. Exp. Immunol. 8: 749-760.

Ibrahim, A.B., G.N. Vyas, H.A. Perkins. 1975. Immune response to hepatitis B surface antigen. Infect. Immun. 11: 137-141

1th International workshop on mechanism of action and characterization of lymphocyte mediators. Bethesda, Maryland, Nov. 1976. Cell. Immunol. 27: 332-358.

Irwin, G.R., W.J. Hierholzer, R. Cimis, R.W. Mc Collum. 1974. Delayed hypersensitivity in hepatitis B: Clinical correlates of in vitro production of migration inhibition factor. J. Infect. Dis. 130:580-587.

Jacobs, D.M., B.W. Janicki. 1977. Workshop on suppression. in: Regulatory mechanisms in lymphocyte activation (Hrsg. D.O. Lucas, Academic Press, New York), S. 819-820.

Janossy, G., M.F. Greaves, M.J. Doenhoff, J. Šnajdr. 1973. Lymphocyte activation. V. Quantitation of the proliferative responses to mitogens using defined T and B cell population. Clin. Exp. Immunol. 14: 581-596.

Jayawardena, A.N., B.H. Waksman. 1977. Suppressor cells in experimental trypanosomiasis. Nature (Lond.) 265: 539-541.

Jegasothy, B.V., A.R. Pachner, B.H. Waksman. 1976. Cytokine inhibition of DNA synthesis: Effect on cyclic adenosine monophosphate in lymphocytes. Science 193: 1260-1261.

Johannsen, R., H. Haupt, H. Bohn, K. Heide, F.R. Seiler, H.G. Schwick. 1976. Inhibition of the mixed leukocyte culture (MLC) by proteins: Mechanism and specificity of the reaction. Z. Immun. Forsch. 152: 280-285.

Kamrin, B.B.. 1959. Successful skin homografts in nature non-littermate rats treated with fractions containing α-globulins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100: 58-61.

Kantor, F.S.. 1975. Infection, anergy and cell-mediated immunity. N.Engl. J. Med. 292: 629-634.

Kaplan, P.M., R.L. Greenman, J.L. Gerin, R.H. Purcell, W.S. Robinson. 1973. DNA-polymerase associated with human hepatitis B antigen. J. Virol. 12:995-1005.

Kasahara, T., K. Shioiri-Nakano. 1976. Splenic suppressing factor: Purification and characterization of a factor suppressing thymidine incorporation into activated lymphocytes. J. Immunol. 116: 1251-1256.

Kawanishi, H., R.P. Mac Dermott. 1977. Induction of antibody-dependent hepatocyte cytotoxicity by chronic active liver disease serum, mediated by normal null cells. Gastroenterology 72: 1078 (Abstr.).

Keller, R.. 1975. Major changes in lymphocyte proliferation evoked by activated macrophages. Cell. Immunol. 17: 542-551.

Keller, R.H., T.B. Tomasi. 1976. Alpha-fetoprotein synthesis by murine lymphoid cells in allogeneic reactions. J. Exp. Med. 143: 1140-1153.

Keller, R.H., W.H.J. Summerskill, A.P. Geubel, R.G. Shorter, T.B. Tomasi. 1976. Alpha-fetoprotein and suppression of cell mediated immunity in chronic active liver disease (CALD). Gastroenterology 70: 901 (Abstr.).

Kirchner, H., H.T. Holden, R.B. Herberman. 1975 a. Splenic suppressor macrophages induced in mice by injection of Corynebacterium parvum. J. Immunol. 115: 1212-1216.

Kirchner, H., H.T. Holden, R.B. Herberman. 1975 b. Inhibition of in vitro growth of lymphoma cells by macrophages from tumor-bearing mice. J. Natl. Cancer Inst. 55: 971-975.

Kirchner, H., G. Darai, K. Keyssner, K. Munk, S.E. Mergenhagen. 1977. Virus - Macrophage - lymphocyte - interactions. in: Regulatory mechanisms in lymphocyte activation (Hrsg. D.O. Lucas, Academic Press, New York), S. 617-619.

Knoke, J., A. Kanaide. A.E. Powell. 1974. Modulation of lymphocytic responses by factors in human plasma. I. The effects on normal, stimulated lymphocytes of various normal plasmas in microplate culture. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 46: 584-599.

Krakauer, R.S., T.A. Waldmann, W. Strober. 1976. Loss of suppressor T cells in adult NZB/NZW mice. J. Exp. Med. 144: 662-673.

Krugman, S., J.H. Hoofnagle, R.J. Gerety, P.M. Kaplan, J.L. Gerin. 1974. Viral hepatitis, type B. DNA polymerase activity and antibody to hepatitis B core antigen. N. Engl. J. Med. 290:1331-1340.

Kunkel, H.G., E.H. Ahrens, W.J. Eisenmenger, A.M. Bongiovanni, R.J. Slater. 1951. Extreme hypergammaglobulinemia in young women with liver disease of unknown etiology. J. Clin. Invest. 30: 654 (Abstr.).

Lee, K.C., D. Berry. 1977. Functional heterogeneity in macrophages activated by Corynebacterium parvum: characterization of subpopulations with different activities in promoting immune responses and suppressing tumor cell growth. J. Immunol. 118: 1530-1540.

Lee, S.T., F. Paraskevas. 1976. Soluble factors in immune sera of mice. I. Specific and non-specific suppressive activity. Clin. Exp. Immunol. 24: 177-184.

Lee, W.M., W.D. Reed, C.G. Mitchell, R.M. Galbraith, A.L.W.F. Eddleston, A.J. Zuckerman, R. Williams. 1975. Cellular and humoral immunity to hepatitis-B surface antigen in active chronic hepatitis. Brit. Med. J. 1: 705-708.

Lee, W.M., W.D. Reed, C.G. Osman, J. Vahrman, A.J. Zuckerman, A.L.W.F. Eddleston, R. Williams. 1977. Immune responses to the hepatitis B surface antigen and liver-specific lipoprotein in acute type B hepatitis. Gut, 18: 250-257.

Levene, G.M., J.L. Turk, D.J.M. Wright, A.G.S. Grimble. 1969. Reduced lymphocyte transformation due to a plasma factor in patients with active syphilis. Lancet II: 246-247.

Lindahl-Magnusson, P., P. Leary, I. Gresser. 1972. Interferon inhibits DNA synthesis induced in mouse lymphocyte suspensions by phytohaemagglutinin or by allogeneic cells. Nature (New Biol.) 237: 120-121.

Littman, B.H., E. Alpert, R.E. Rocklin. 1977. The effect of purified α-feto-protein on in vitro assays of cell-mediated immunity. Cell. Immunol. 30: 35-43.

Lopatin, D.E., D.F. Ranney. 1977. Maintenance of the resting state and potential regulators of the proliferative phase. in: Regulatory mechanisms in lymphocyte activation (Hrsg. D.O. Lucas, Academic Press, New York), S. 195-216.

Lucas. D.O., G. Klimpel. 1977. Parameters of lymphocyte activation. in: Regulatory mechanisms in lymphocyte activation (Hrsg. D.O. Lucas, Academic Press, New York), S. 76-89.

Luquetti, A., G. Janossy. 1976. Lymphocyte activation. VIII. The application of a whole blood test to the quantitative analysis of PHA responsive cells. J. Immunol. Methods 10: 7 - 25.

Mackay, I.R., L.I. Taft, D.C. Cowling. 1956. Lupoid hepatitis. Lancet II: 1323.

Maclachlan, M.J., G.P. Rodnan, W.M. Cooper, R.H. Fennell. 1965. Chronic active (lupoid) hepatitis. A clinical, serological and pathological study of 20 patients. Ann. Intern. Med. 62: 424-462.

Mac Sween, R.N.M., M.A. Thomas. 1973. Lymphocyte transformation by phytohaemagglutinin (PHA) and purified protein derivative (PPD) in primary biliary cirrhosis. Clin. Exp. Immunol. 15: 523-533.

Magnius, L.O., J.A. Espmark. 1972. New specificities in Australia antigen-positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. J. Immunol. 109: 1017-1021.

Maisch, B., P. Schuff-Werner, P.A. Berg, K. Kochsiek. 1978. Clinical significance of immunopathological findings in patients with postcardiotomy syndrome. II. The significance of serum inhibition and rosette inhibitory factors. zur Veröffentl. einger.

Malavé, I., Z. Layrisse, M. Layrisse. 1975. Dose-dependent hyporeactivity to phytohemagglutinin in systemic lupus erythematosus. Cell. Immunol. 15: 231-236.

Mangi, R.J., J.M. Dwyer, F.S. Kantor. 1974. The effect of plasma upon lymphocyte response in vitro. Demonstration of a humoral inhibitor in patients with sarcoidosis. Clin. Exp. Immunol. 18: 519-528.

Martini, G.A., R. Rössler, K. Havemann, W. Dölle. 1970. Inhibited lymphocytic response to phytohemagglutinin in acute infectious hepatitis; indirect evidence for virus persistence in chronic aggressive hepatitis? Scand. J. Gastroent. (Suppl.) 7: 39-46.

Martini, G.A., C.P. Sodomann. 1975. Cellular immune reactions in chronic hepatitis. Symposium über "Chronic hepatitis" Montecatini, Italien, April 1975.

Masters, L., J. Shimizu, G.A. Granger. 1976. Detection of lymphotoxin in vivo in the sera of human patients with several types of suspected autoimmune diseases. Cell. Immunol. 27: 352 (Abstr.).

Mc Devitt, H.O., W.F. Bodmer. 1974. HL-A, immune response genes, and disease. Lancet I: 1269-1275.

Mc Devitt, H.O., T.L. Delovitch, J.L. Press, D.B. Murphy. 1976. Genetic and functional analysis of the I a antigens: Their possible role in regulation of the immune response. Transpl. Rev. 30: 197-235.

Mc Farlin, D.E., J.J. Oppenheim. 1969. Impaired lymphocyte transformation in ataxia telangiectasia in part due to a plasma inhibitory factor. J. Immunol. 103: 1212-1222.

Mc Intyre, O.R., A.F. Cole. 1969. Variation in the response of normal lymphocytes to PHA. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 35: 105-118.

Mc Master, R., J.G. Levy. 1975. Immunosuppression of normal lymphoid cells by serum from mice undergoing chronic graft-vs-host disease. J. Immunol. 115:1400-1403.

Mella, B.. 1969. Use of PHA stimulated lymphocyte cultures for detecting the agent of hepatitis. Vox Sang. 17: 45-49.

Mella, B., D.J. Lang. 1967. Leucocyte mitosis: suppression in vitro associated with acute infectious hepatitis. Science, 155: 80-81.

Mellstedt, H.. 1975. In vitro activation of human T and B lymphocytes by pokeweed mitogen. Clin. Exp. Immunol. 19: 75-82.

Menzoian, J.O., A.H. Glasgow, R.D. Nimberg, S.R. Cooperband, K. Schmid, J.Saporoschetz, J.A. Mannick. 1974. Regulation of T lymphocytefunction by immunoregulatory α-globulin (IRA). J. Immunol. 113: 266-273.

Meyer zum Büschenfelde, K.H., F.K. Kössling, P.A. Miescher. 1972. Experimental chronic active hepatitis in rabbits following immunization with human liver proteins. Clin. Exp. Immunol. 11: 99-108.

Meyer zum Büschenfelde, K.H., W. Arnold, J. Knolle, G. Hess. 1976. Immunreaktionen gegenüber HB$_s$Ag, HB$_c$Ag und 'e'-Antigen bei akuter Virushepatitis sowie lebergesunden und leberkranken HB$_s$Ag-Trägern. Z. Gastroenterol. 14: 365-377.

Miller, F. 1976. Serum-derived immunosuppressive substances. I. Partial purification and range of action. Transplantation 21: 179-187.

Milton, J.D., J.F. Mowbray. 1969. In vivo immunosuppressive and in vitro antiproliferative activity of polyribonuclease. Transpl. Proc. 1: 511-515.

Mitchell, M.S., D. Kirkpatrick, M.B. Mokyr, I. Gery. 1973. On the mode of action of BCG. Nature (New Biol.) 243: 216-218.

Möller, G., P. Landwall. 1977. The polyclonal B-cell-activating property of protein A is not due to its interaction with the Fc part of immunoglobulin receptors. Scand. J. Immunol. 6: 357-366.

Moore, D.L., B. Heyworth, J. Brown. 1977. Effects of autologous plasma on lymphocyte transformation in malaria und in acute protein-energy mal nutrition. Comparison of purified lymphocyte and whole blood cultures. Immunology 33: 777-785.

Moorthy, A.V., S.W. Zimmerman, P.M. Burkholder. 1976. Inhibition of lymphocyte blastogenesis by plasma of patients with minimal-change nephrotic syndrome. Lancet I: 1160-1162.

Morse, J.H. 1968. Immunological studies of phytohaemagglutinin I. Reaction between phytohaemagglutinin and normal sera. Immunology 14: 713-724.

Mortensen, R.F., A.P. Osmand, H. Gewurz. 1975. Effects of C-reactive protein on the lymphoid system. I. Binding to thymus-dependent lymphocytes and alteration of their functions. J. Exp. Med. 141: 821-839.

Mortensen, R.F., H. Gewurz. 1976. Effects of C-reactive protein on the lymphoid system. II. Inhibition of mixed lymphocyte reactivity and generation of cytotoxic lymphocytes. J. Immunol. 116: 1244-1250.

Mortensen, R.F., D. Braun, H. Gewurz. 1977. Effects of C-reactive protein on lymphocyte functions. III. Inhibition of antigen-induced lymphocyte stimulation and lymphokine production. Cell. Immunol. 28: 59-68.

Mosier, D.E., B.M. Johnson. 1975. Ontogeny of mouse lymphocyte function. II. Development of the ability to produce antibody is modulated by T lymphocytes. J. Exp. Med. 141: 216-226.

Mowbray, J.F.. 1963. Ability of large doses of an α_2-plasma protein fraction to inhibit antibody production. Immunology 6: 217-225.

Murgita, R.A., R.B. Tomasi. 1975 a. Suppression of the immune response by α-fetoprotein. I. The effect of mouse α-fetoprotein on the primary and secondary antibody response. J. Exp. Med. 141: 269-286.

Murgita, R.A., T.B. Tomasi. 1975 b. Suppression of the immune response by α-fetoprotein. II. The effect of mouse α-fetoprotein on mixed lymphocyte reactivity and mitogen-induced lymphocyte transformation. J. Exp. Med. 141: 440-452.

Nakao, M., Y. Mizoguchi, T. Monna, S. Yamamoto, S. Morisawa. 1975. Studies on the subpopulation and function of peripheral lymphocytes, and inhibitor to PHA stimulation existing in the serum of patients with liver disease. Gastroenterol. Jap. 10: 307-315.

Namba, Y., B.H. Waksman. 1975. Regulatory substances produced by lymphoytes. I. Inhibitor of DNA synthesis in the rat. Inflammation 1: 5-11.

Namba, Y., B.V. Jegasothy, B.H. Waksman. 1977. Regulatory substances produced by lymphocytes. V. Production of inhibitor of DNA synthesis (IDS) by proliferating T lymphocytes. J. Immunol. 118: 1379-1884.

Nelken, D. 1973.. Normal immunosuppressive protein (NIP). J. Immunol. 110: 1161-1162.

Nelson, D.S.. 1972. Mouse serum factor depressing lymphocyte transformation. Experienta 28: 1227-1228.

Nelson, D.S.. 1973. Production by stimulated macrophages of factors depressing lymphocyte transformation. Nature (Lond.) 246: 306-307.

Nelson, D.S.. 1976. Non-specific immunoregulation by macrophages and their products. in: Immunobiology of the macrophage (Hrsg. D.S. Nelson, Academic Press, New York), S. 235-257.

Nelson, D.S., C.N. Shneider. 1974. Effect of normal mouse serum on mouse lymphocyte transformation in vitro. Eur. J. Immunol. 4: 79-86.

Nelson, D.S., J.M. Penrose. 1975. Effect of hemodialysis and transplantation on inhibition of lymphocyte transformation by sera from uremic patients. Clin. Immunol. Immunopathol. 4: 143-146.

Nelson, D.S., J.M. Penrose, M.F.R. Waters, J.M.H. Pearson, M. Nelson. 1975. Depressive effect of serum from patients with leprosy on mixed lymphocyte reactions. Influence of anti-leprosy treatment. Clin.Exp. Immunol. 22: 385-392.

Nelson, D.S., R.A. Gatti. 1976. Humoral factors influencing lymphocyte transformation. Prog. Allergy 21: 261-341.

Newberry, W.M., J.W. Chandler, T.D.Y. Chiu, C.H. Kirkpatrick. 1968. Immunology of the mycoses. I. Depressed lymphocyte transformation in chronic histoplasmosis. J. Immunol. 100: 436-443.

Newberry, W.M., J.P. Sanford. 1971. Defective cellular immunity in renal failure: Depression of reactivity of lymphocytes to phytohemagglutinin by renal failure serum. J. Clin. Invest. 50: 1262-1271.

Newberry, W.M., J.M. Shorey, J.P. Sanford, B. Combes. 1973. Depression of lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin by serum from patients with liver disease. Cell. Immunol. 6: 87-97

Newble, D.I., K.T. Holmes, A.G. Wangel, I.J. Forbes. 1975. Immune reactions in acute viral hepatitis. Clin. Exp. Immunol. 20: 17-28.

Nielsen, J.O., V. Reinicke, O. Dietrichson, V. Andersen, M. Thomsen, E. Andersen. 1973. Immunologic studies of Australia antigen carriers with and without liver diseases. Clin. Exp. Immunol. 15: 9-16.

Nielsen, J.O., O. Dietrichson, E. Juhl. 1974. Incidence and meaning of the e-determinant among hepatitis B antigen-positive patients with acute and chronic liver diseases. Report from the Copenhagen Hepatitis Acuta Programme. Lancet II: 913-915.

Nordenfelt, E., L. Kjellén. 1975. Dane particles, DNA polymerase and e-antigen in two different categories of hepatitis B antigen carriers. Intervirology 5: 225-232.

Nordenfelt, E., M. Andrén-Sandberg. 1976. Dane particle-associated DNA polymerase and e-antigen: Relation to chronic hepatitis among carriers of hepatitis B surface antigen. J. Infect. Dis. 134: 85-89.

Nossel, H.L., I. Yudelman, R.E. Canfield, V.P. Butler, K. Spanondis, G.D. Wilner, G.D. Qureski. 1974. Measurement of fibrinopeptide A in human blood. J. Clin. Invest. 54: 43-53.

Ohler, W.G.A.. 1977. Leberversagen und Gerinnungsstörungen. Leber Magen Darm 7: 270-276.

Opitz, H.G., D. Niethammer, R.C. Jackson. H. Lemke, R. Huget, H.D. Flad. 1975. Biochemical characterization of a factor released by macrophages. Cell. Immunol. 18: 70-75.

Oppenheim, J.J., D.L. Rosenstreich. 1976. Lymphocyte transformation: utilizat] on of automatic harvesters. in: In vitro methods of cell-mediated and tumor immunity (Hrsg. B.R. Bloom u. J.R. David, Academic Press, New York), S. 573-585.

Ortmans, H., P.A. Berg, E. Wildhirt, O. Klinge. 1977. Klinische Relevanz des Nachweises der Serumhemmfaktoren-Aktivität bei Patienten mit HB Ag-positiven chronischen Hepatitiden. Arbeitstagung des DFG-Schwerpunktes Virushepatitis in Göttingen.

Pang, T., R.V. Blanden. 1976. Regulation of the T-cell response to ectromelia virus infection. I. Feedback suppression by effector T cells. J. Exp. Med. 143: 469-481.

Papermaster, B.W., A.S. Miller, C.M. Skisak, J.E. Mc Entire.1976 . Effect of mediators on tumor regression. Cell. Immunol. 27: 357 (Abstr.).

Pappas, A., R. Phlippen, T. Pütz, P.G. Scheurlen. 1970. Beeinträchtigung der cellulären Immunreaktion im Anfangsstadium der akuten infektiösen Hepatitis. Klin. Wschr. 48: 1362-1365.

Pappas, A., H. Pees, G. Girmann. 1977. A micro-method for PHA-induced stimulation of human lymphocytes. II. communication: Effect of splenectomy on the inhibitory activity of serum in patients with Hodgkin's disease. Z. Immun. Forsch. 153: 1-10.

Paronetto, F., S. Vernace. 1975. Immunological studies in patients with chronic active hepatitis. Cytotoxic activity of lymphocytes to autochthonous liver cells grown in tissue culture. Clin. Exp. Immunol. 19: 99-104.

Paterson, P.Y., R. Semo, G. Blumenschein, J. Swelstad. 1971. Mucocutaneous candidiasis, anergy and a plasma inhibitor of cellular immunity: Reversal after amphotericin B therapy. Clin. Exp. Immunol. 9: 595-602.

Pope, B.L., R.B. Whitney, J.G. Levy, D.G. Kilburn. 1976. Suppressor cells in the spleens of tumor-bearing mice: enrichment by centrifugation on hypaque-ficoll and characterization of the suppressor population. J. Immunol. 116: 1342-1346.

Popper, H., I.R. Mackay. 1972. Relation between Australia antigen and autoimmune hepatitis. Lancet I: 1161-1163.

Pross., H.F., D. Eidinger. 1974. Antigenic competition: A review of nonspecific antigen-induced suppression. Adv. Immunol. 18: 133-168.

Ranney, D.F. 1977. An integrative approach to activation and sequential metabolic regulation of the immune response. in: Regulatory mechanisms in lymphocyte activation (Hrsg. D.O. Lucas, Academic Press, New York), S. 3-33.

Rich, R.R., C.W. Pierce. 1974. Biological expressions of lymphocyte activation. III. Suppression of plaque forming cell responses in vitro by supernatant fluids from concanavalin A-activated spleen cell cultures. J. Immunol. 112: 1360-1368.

Riggio, R.R., G.H. Schwartz, F.G. Bull, K.H. Stenzel, A.L. Rubin. 1969. α_2-globulins in renal graft rejection. Effects on in vitro lymphocyte function. Transplantation 8: 689-694.

Roberts, I.M., C.C. Bernard, G.N. Vyas, I.R. Mackay. 1975. T-cell dependency of immune response to hepatitis B antigen in mice. Nature (Lond.) 254: 606-607.

Robinson, W.S., R.L. Greenman. 1974. DNA-polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. J. Virol. 13: 1231-1236.

Rocklin, R.F. 1973. Production of migration inhibitory factor by non-dividing lymphocytes. J. Immunol. 110: 674-678.

Rola-Pleszczynski, M., S.A. Hensen, M.M. Vincent, J.A. Bellanti. 1975. Inhibitory effects of bilirubin on cellular immune responses in man. J. Pediatr. 86: 690-696.

Rosenthal, C.J., E.C. Franklin. 1977. Serum amyloid A (SAA) protein-interaction with itself and serum albumin. J. Immunol. 119: 630-634.

Sakane, T., I. Green. 1978. Protein A from Staphylococcus aureus - a mitogen for human T lymphocytes and B lymphocytes but not of L lymphocytes. J. Immunol. 120: 302-311.

Salvin, S.B., J. Nishio, J.T. Shonnard. 1974. Two new inhibitory activities in blood of mice with delayed hypersensitivity, after challenge with specific antigen. Infect Immun. 9: 631-635.

Schalm, S.W., W.H.J. Summerskill, V.L.W. Go. 1977. Prednisone for chronic active liver disease: pharmacokinetics, including conversion to prednisolone. Gastroenterology 72: 910-913.

Schumacher, K., G. Maerker-Alzer, U. Wehmer. 1974. A lymphocyte-inhibiting factor isolated from normal human liver. Nature (Lond.) 251: 655-656.

Schumacher, K., G. Maerker-Alzer, K.J. Lukowski. 1975. Zelluläre Immunreaktionen bei akuter und chronischer Virushepatitis. Immun. Infekt. 3: 182-187.

Scott, M.T. 1972. Biological effects of the adjuvant Corynebacterium parvum. II. Evidence for macrophage-T cell interaction. Cell. Immunol. 5: 469-479.

Silver, H.K.B., J. Deneault, P. Gold, W. Thompson, J. Shuster, S.O. Freedman. 1974. The detection of α_1-fetoprotein in patients with viral hepatitis. Cancer Res. 34: 244-247.

Sipe, J.D., T.F. Ignaczak, P.S. Pollock, G.G. Glenner. 1976. Amyloid fibril protein AA: Purification and properties of the antigenically related serum component as determined by solid phase radioimmunoassay. J. Immunol. 116: 1151-1156.

Sjöberg, O. 1972. Effect of allogeneic cell interaction on the primary immune response in vitro. Cell types involved in suppression and stimulation of antibody synthesis. Clin. Exp. Immunol. 12: 365-375.

Sodomann, C.P., K. Havemann, G.A. Martini. 1974. Cellular immune reactions in the course of virus-hepatitis. Digestion 10: 328-329 (Abstr.).

Suciu-Foca, N., J.A. Buda, J. Mc Manus, T. Thiem, K. Reemtsma. 1973. Impaired responsiveness of lymphocytes and serum-inhibitory factors in patients with cancer. Cancer Res. 33: 2373-2377.

Suciu-Foca, N., J.A. Buda, T. Thiem, K. Reemtsma. 1974. Impaired responsiveness of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 18: 295-301.

Swick, H.M., W.H. Brooks, T.L. Roszman, D. Caldwell. 1976. A heat-stable blocking factor in the plasma of patients with subacute sclerosing panencephalitis. Neurology 26: 84-88.

Tavadia, H.B., R.B.Goudie, W.D. Nicoll. 1974. Inhibition of normal lymphocyte transformation by plasma and lymphocyte factors in chronic lymphatic leukemia. Clin. Exp. Immunol. 16: 177-182.

Thamer, G., K. Gmelin, B. Kommerell. 1976. Das e-Antigen. Dtsch.Med.Wschr. 101: 1573-1575.

Thestrup-Pedersen, K., K. Ladefoged, P. Andersen. 1976. Lymphocyte transformation test with liver-specific protein and phytohaemagglutinin in patients with liver disease. Clin. Exp. Immunol. 24: 1-8.

Thomas, H.C., M. Freni, J. Sanchez-Tapias, D. De Villiers, S. Jain, S. Sherlock. 1976. Peripheral blood lymphocyte populations in chronic liver disease. Clin. Exp. Immunol. 26: 222-227.

Thomas, H.C., B.J. Potter, D. De Villiers, S. Jain, H. Hodgon, S. Sherlock. 1977. C1q binding, anti-complementary activity and immunoconglutinins on acute and chronic liver disease. in: 12 th Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), (Hrsg. Karger, Basel), Nr. 259 (Abstr.).

Thomson, A.D., M.A.G. Cochrane, I.G. Mc Farlane, A.L.W.F. Eddleston, R. Williams. 1974. Lymphocyte cytotoxicity to isolated hepatocytes in chronic active hepatitis. Nature (Lond.) 252: 721-722.

Toh, B.H., I.C. Roberts-Thomson, J.D. Mathews, S. Whittingham, I.R. Mackay. 1973. Depression of cell-mediated immunity in old age and immunopathic diseases, lupus erythematosus, chronic hepatitis and rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Immunol. 14: 193-202.

Tolentino, P., F. Dianzani, M. Zucca, R. Giacchino. 1975. Decreased interferon response by lymphocytes from children with chronic hepatitis. J. Infect. Dis. 132: 459-461.

Tomasi, T.B.. 1977. Serum factors which suppress the immune response. in: Regulatory mechanisms in lymphocyte activation (Hrsg. D.O. Lucas, Academic Press, New York), S. 219-248.

Tong, M.J., A.M. Wallace, R.L. Peters, T.B. Reynolds. 1975. Lymphocyte stimulation in hepatitis B infections. N. Engl. J. Med. 14: 318-322.

Touraine, J.L., F. Touraine, J.P. Revillard, J. Brochier, J. Traeger. 1975. T-lymphocytes and serum inhibitors of cell-mediated immunity in renal insufficiency. Nephron 14: 195-208.

Tremolada, F., G. Fattovich, M. Angi, L. Rude, R. Realdi. 1977. Lymphocyte function and serum factors in HB$_s$Ag-positive acute (AH) and chronic active hepatitis (CAH) and in chronic healthy carriers (CHC). in: 12th Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) (Hrsg. Karger, Basel), Nr. 261 (Abstr.).

Trubowitz, S., B. Masek, A. Rosario. 1966. Lymphocyte response to phytohemagglutinin in Hodgkin's disease, lymphatic leukemia and lymphosarcoma. Cancer 19: 2019-2023.

Twomey, J.J., C.C. Waddell, S. Krantz, R. O'Reilly, P. L'Esperance, R.A. Good. 1975. Chronic mucocutaneous candidiasis with macrophage dysfunction, a plasma inhibitor and co-existent aplastic anemia. J. Lab. Clin. Med. 85: 968-977.

Veit, B.C., J.G. Michael. 1972. Immune response suppression by an inhibitor in normal and immune mouse serum. Nature (New Biol.) 235: 238-240.

Veit, B.C., J.G. Michael. 1973. Characterization of an immunosuppressive factor present in mouse serum. J. Immunol. 111: 341-351.

Virelizier, J.L., E.L. Chan, A.C. Allison. 1977. Immunosuppressive effects of lymphocyte (type II) and leucocyte (type I) interferon on primary antibody responses in vivo and in vitro. Clin. Exp. Immunol. 30: 299-304.

Voorting-Hawking. M., J.G. Michael. 1977. Isolation and characterization of immunoregulatory factors from normal human serum. I. Preliminary biochemical and biological characterization of immunosuppressive factors. J. Immunol. 118: 505-513.

Waksman, B.H.. 1977. Tolerance, the thymus, and suppressor T cells. Clin. Exp. Immunol. 28: 363-374.

Waksman, B.H., Y. Namba. 1976. On soluble mediators of immunologic regulation. Cell. Immunol. 21: 161-176.

Waldenström, J.. 1950. Leber, Blutproteine und Nahrungseiweiß. 15. Tagg. Dtsch. Ges. Verd. u. Stoffwechselkrankheiten, Bad Kissingen, S. 8.

Waldman, S.R., A.A. Gottlieb. 1973. Macrophage regulation of DNA synthesis in lymphoid cells: effects of a soluble factor from macrophages. Cell. Immunol. 9: 142-156.

Wands, J.R., J.L. Perrotto, E. Alpert, K.J. Isselbacher. 1975 a. Cell-mediated immunity in acute and chronic hepatitis. J. Clin. Invest. 55: 921-929.

Wands, J.R., E. Alpert, K.J. Isselbacher. 1975 b. Serial studies and partial characterization of a serum inhibitor of cellular immunity in acute hepatitis-B and chronic active hepatitis. Gastroenterology 69: 878 (Abstr.).

Wands, J.R., E. Mann, E. Alpert, K.J. Isselbacher. 1975 c. The pathogenesis of arthritis associated with acute hepatitis-B surface antigen-positive hepatitis. Complement activation and characterization of circulating immune complexes. J. Clin. Invest. 55: 930-936.

Wang, B.S., A.M. Badger, R.R. Nimberg, S.R. Cooperband, K. Schmid, J.A. Mannick. 1977. Suppression of tumor-specific cell-mediated cytotoxicity by immunoregulatory α-globulin and by immunoregulatory α-globulin-like peptides from cancer patients. Cancer Res. 37: 3022-3025.

Webel, M.L., W.A. Briggs, R.E. Ritts. 1975. Studies of mitogen-induced lymphocyte transformation by a semi-microtechnic. Am. J. Clin. Pathol. 64: 41-47.

Weinstein, Y., B.R. Brodeur, K.L. Melmon, T.C. Merigan. 1977. Interferon inhibition of lymphocyte mitogenesis. Immunology 33: 313-319.

Weksler, M.E., M.M. Kuntz. 1976. Synergy between human T and B lymphocytes in their response to phytohaemagglutinin and pokeweed mitogen. Immunology 31: 273-281.

Wernet, P., H.G. Kunkel. 1973. Antibodies to a specific surface antigen of T cells in human sera inhibiting mixed leukocyte culture reactions. J. Exp. Med. 138: 1021-1026.

Wheelock, E.F., S. Schenker, B. Combes. 1968. Absence of circulating interferon in patients with infectious and serum hepatitis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128: 251-253.

Wicher, V., K. Wicher. 1977. In vitro cell response of treponema pallidum-infected rabbits. II. Inhibition of lymphocyte response to phytohaemagglutinin by serum of T.pallidum-infected rabbits. Clin. Exp. Immunol. 29: 487-495.

Wicks, R.C., P.F. Kohler, J.W. Singleton. 1975. Thymus-derived lymphocytes in type B acute viral hepatitis and healthy carriers of hepatitis B surface antigen (HB_sAg). Digest. Dis. 20: 518-522.

Wieczorek, Z., G. Skibinski, J. Zwolinski. 1977. Characterization of lymphocyte E rosette inhibitory factor in sera from tuberculous patients. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 25: 63-68.

Willems, F.T.C., J.L. Melnick, W.E. Rawls. 1969. Viral inhibition of the PHA response of human lymphocytes and application to the viral hepatitis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130: 652-661.

Wood, D.D., S.L. Gaul. 1974. Enhancement of the humoral response of T cell-depleted murine spleen by a factor derived from human monocytes in vitro. J. Immunol. 113: 925-933.

Wood, T.A., E.P. Frenkel. 1967. The atypical lymphocyte. Ann. J. Med. 42: 923-936.

Yachnin, S.. 1976. Demonstration of the inhibitory effect of human alpha-fetoprotein on in vitro transformation of human lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 2857-2861.

Yachnin, S., E.P. Lester. 1977. Inhibition of human lymphocyte transformation by human -fetoprotein (HAFP); HAFP monomers and multimers and a resistent lymphocyte population. J. Immunol. 119: 555-557.

Yamamura, M.. 1973. Standardization of lymphocyte transformation to phytohaemagglutinin. Clin. Exp. Immunol. 14: 457-467.

Yamamura, M., B. Nikbin, J.R. Hobbs. 1976. Standardization of the mixed lymphocyte reaction. J. Immunol. Methods 10: 367-378.

Yeung-Laiwah, A.A.C., A.K.R. Chaudhuri, J.R. Anderson. 1973. Lymphocyte transformation and leucocyte migration-inhibition by Australia antigen. Clin. Exp. Immunol. 15: 27-34.

Yoshida, T., R. Edelson, S. Cohen, I. Green. 1975. Migration inhibitory activity in serum and cell supernatants in patients with sezary syndrome. J. Immunol. 114: 915-918.

Yoshida, T., V. Papermaster, H. Sonozaki, S. Cohen. 1976. The role of soluble mediators in the desensitization of delayed hypersensitivity. Cell. Immunol. 27: 356 (Abstr.).

Zubler, R.H., L.H. Perrin, W.D. Creighton, P.H. Lambert. 1977. Use of polyethylene glycol (PEG) to concentrate immune complexes from serum or plasma samples. Ann. Rheum. Dis. 36 (Suppl. 1): 23-26.

Zuckerman, A.J.. 1969. Viral hepatitis and Australia-SH-antigen. Nature (Lond.) 223: 569-572.

Lebenslauf

Am 11.11.1943 wurde ich, Norbert Brattig, als Sohn des Dr. med. Wolfgang Brattig und der Photographin Liselotte Brattig, geb. Röver, in Göttingen geboren. Von 1950 - 1954 besuchte ich die Grundschule in Bantorf bei Hannover und anschließend das Neusprachliche Gymnasium in Bad Nenndorf bis zum Abitur im Februar 1964.

Nach 2 Jahren bei der Bundeswehr begann ich im Sommersemester 1966 an der Philipps-Universität Marburg zunächst Mathematik und Theologie zu studieren. Mein Biologiestudium nahm ich im Sommersemester 1967 an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf und legte dort im Oktober 1969 das Vordiplom ab. Anschließend studierte ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen die Fächer Mikrobiologie, Biochemie, Botanik und organische Chemie bis zum Diplom im Juni 1972. Die Diplomarbeit machte ich im Max-Planck-Institut für Virusforschung bei Dr. K. U. Hartmann.

Unter der Leitung von Prof. Dr. P.A. Berg begann ich an der Medizinischen Klinik Tübingen Ende 1972 mit in vitro Untersuchungen über zellvermittelte Immunreaktionen bei Patienten mit Hepatitis. Die vorliegende Arbeit umfaßt hauptsächlich Untersuchungen aus den Jahren 1975 - 1977.

Meine akademischen Lehrer waren:

Immunologie	P.A. Berg, K.U. Hartmann, H. Friedrich-Freksa, E. Wecker
Mikrobiologie	H. Zähner, W. Löffler, M. Ehrenberg
Biochemie	H. Metzner, G. Hartmann
Botanik	B. Schwemmle, W. Simonis, O.L. Lange
Zoologie	K.G. Grell, W. Krause
Chemie	E. Bayer, M. Schmidt

Druck: Reprografik E. Müllerbader
Forststrasse 18
7024 Filderstadt 4 (Plattenhardt)
Telefon (0711) 77 15 67